



Unione europea
Fondo sociale europeo



*Ministero dell'Istruzione
dell'Università e Ricerca*



dibimef

Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche e Forensi
Università degli studi di Palermo



Dottorato di Ricerca in Immunofarmacologia XXII ciclo
Coordinatore Chiar.mo Prof. Francesco Dieli

**Polimorfismi genetici e suscettibilità
individuale nello sviluppo di
allergopatie respiratorie**

Effetti di DEPs ed allergeni in cellule di epitelio bronchiale

Settore scientifico-disciplinare MED/04

**Tesi di Dottorato della
Dott.ssa Simona Principe**

**Tutor
Chiar.mo Prof. G. De Leo**

**co-Tutor
Chiar.mo Prof. R. Alessandro**

2008/2010

INDICE

Premessa	pag. 1
-----------------------	--------

INTRODUZIONE

Le allergopatie respiratorie

Dati epidemiologici	pag. 3
Le malattie multifattoriali	pag. 6
Identificazione di varianti genetiche nelle patologie complesse	pag. 8
Il progetto HapMap	pag. 9
Studi di linkage genome-wide	pag. 10
Variazioni epigenetiche nelle patologie allergiche	pag. 12

Asma e rinite

Epidemiologia	pag. 16
Definizione e aspetti clinici	pag. 16

Basi genetiche dell'asma

Geni candidati e loci di suscettibilità	pag. 20
Locus 17q21 e ORMDL3/GSDML	pag. 22
Variabilità genetica in enzimi detossificanti: sistema GST.....	pag. 25

Allergie e ambiente

Inquinanti ambientali e pollini	pag. 28
La parietaria judaica	pag. 29
PM e DEPs: caratteristiche generali	pag. 31
Effetti sulla salute respiratoria	pag. 33
DEPs ed effetti biologici	pag. 35

MATERIALI E METODI

Campionamento	pag. 39
Estrazione del DNA genomico	pag. 40
Genotipizzazione	pag. 41
Analisi statistiche	pag. 43
Colture cellulari	pag. 44
Esposizione ai DEPs e all'estratto proteico di <i>Parietaria judaica</i>	pag. 44
Proliferazione cellulare	pag. 45
Estrazione di RNA e retro trascrizione	pag. 45
Real Time PCR	pag. 46
Analisi del citoscheletro ed immunofluorescenza	pag. 46
Saggi di motilità: Camera di Boyden e Wound-healing assay	pag. 47
Estrazione e quantizzazione delle proteine totali	pag. 49
Analisi di Western Blot	pag. 50
Saggio di adesione dei PMN alle A549: isolamento dei polimorfonucleati (PMN) e colorazione con mieloperossidasi	pag. 51

RISULTATI E DISCUSSIONE (I)

Analisi di polimorfismi genetici e suscettibilità individuale nelle allergopatie respiratorie

Campionamento	pag. 52
Analisi del DNA genomico	pag. 54
Genotipizzazione	pag. 54
Analisi statistiche	pag. 57
Associazione tra la regione 17q21 e le allergopatie respiratorie	pag. 58
Identificazione di un aplotipo di rischio nella regione 17q21	pag. 63
Analisi della variante A313G del gene GSTP1	pag. 66
Conclusioni (I)	pag. 69

RISULTATI E DISCUSSIONE (II)

Effetti di DEPs ed allergeni in cellule di epitelio bronchiale

Effetti dei DEPs e dell'estratto di Pj sulla vitalità cellulare.....	pag. 70
Effetti dei DEPs e degli allergeni di Parietaria sulla permeabilità epiteliale <i>Analisi del citoscheletro</i>	pag. 71
Effetti dei DEPs e del polline sull'espressione dell'E-caderina <i>Valutazione dell'espressione genica e dei livelli di proteina totali</i>	pag. 74
<i>Analisi di immunofluorescenza</i>	pag. 77
Effetti dei DEPs e dell'estratto di Parietaria sulla localizzazione della β -catenina <i>Analisi di immunofluorescenza</i>	pag. 78
Effetti dei DEPs e delle proteine di Parietaria sulla motilità delle A549 <i>Wound healing assay</i>	pag. 79
<i>Saggio di motilità con camera di Boyden</i>	pag. 81
Aumento di mediatori solubili e di molecole di adesione coinvolte nella risposta immunologico-infiammatoria <i>Espressione genica dell'interleuchina-8</i>	pag. 83
<i>Aumento di espressione di ICAM-1</i>	pag. 84
Reclutamento di componenti cellulari pro-infiammatorie <i>Saggio di adesione dei PMN al monostrato epiteliale</i>	pag. 86
Conclusioni (II)	pag. 88

BIBLIOGRAFIA	pag. 89
---------------------------	---------

PREMESSA

Le patologie allergiche rappresentano un esempio di disordini genetici complessi e sono caratterizzate da un'elevata eterogeneità fenotipica che dipende dagli effetti combinati di più loci genici e numerosi fattori ambientali, ciascuno con gradi variabili di coinvolgimento individuale.

Lo studio delle interazioni geni-ambiente prende in esame dei modelli in cui è importante considerare che determinati genotipi possano produrre i rispettivi fenotipi, solo in certe situazioni di esposizione ambientale.

Se da una lato, i progressi tecnologici in ambito genetico, hanno dato sempre più importanza agli studi di associazione nel campo della ricerca allergologica, allo stesso tempo, è cresciuta anche la considerazione dell'influenza dei fattori ambientali (allergeni, fumo di sigaretta ed inquinanti) nello sviluppo delle allergopatie respiratorie.

L'attività di ricerca descritta nella prima parte della tesi di dottorato, e svolta presso il Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche e Forensi, si è inserita all'interno di un progetto, finanziato nel corso del 2007-2008 dall'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente (ARPA-Sicilia), in collaborazione con l'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare (IBIM) del CNR di Palermo.

Il progetto ha indagato gli effetti dell'ambiente sulle patologie respiratorie, basandosi su un'analisi multiparametrica ed interdisciplinare di un campione rappresentativo della popolazione scolastica, della città di Palermo.

Parallelamente alla valutazione, strettamente clinica, degli effetti di inquinanti atmosferici ed allergeni sulla salute respiratoria dei soggetti presi in esame, sono state da noi analizzate alcune varianti genetiche correlate al rischio individuale di sviluppare allergopatie respiratorie.

La ricerca di fattori di rischio sia genetici che ambientali nell'ambito delle allergie, ha evidenziato l'importanza dell'interazione tra determinanti genetici ed inquinanti aerei occasionali ad esposizione sporadica.

E' ampiamente documentato come, gli inquinanti presenti nell'atmosfera, determinino un aumento dello stato infiammatorio a livello bronchiale (proliferazione delle cellule infiammatorie) e sistemico (incremento delle IgE), ed una maggiore reattività del soggetto verso gli allergeni inalati.

Sulla base di tali indicazioni sperimentali, nella seconda parte della tesi si è voluto analizzare in un opportuno sistema *in vitro* di epitelio bronchiale, gli effetti dei pollini e degli inquinanti in modo di ricreare la condizione flogistica acuta dell'epitelio polmonare. Questa

parte dello studio, si è focalizzata sulla valutazione delle interazioni tra aeroallergeni e materiale particolato e sugli effetti combinati che questi composti esercitano a livello cellulare e molecolare.

INTRODUZIONE

LE ALLERGOPATIE RESPIRATORIE

Dati epidemiologici

Le allergie respiratorie sono malattie infiammatorie delle vie aeree caratterizzate da una considerevole eterogeneità sia nel fenotipo che nella fisiopatologia.

Dal punto di vista clinico l'asma bronchiale e la rinite allergica rappresentano le allergopatie più frequenti; inoltre, tali sindromi, pur manifestandosi a qualsiasi età, si sviluppano prevalentemente nell'infanzia o nell'adolescenza (Galassi C. 2006).

Numerosi studi epidemiologici, evidenziano l'eterogeneità ed il progressivo aumento di incidenza di tali patologie soprattutto nelle aree metropolitane più industrializzate, correlando le allergie respiratorie con diversi fattori scatenanti: stili di vita, condizioni climatiche, fonti di inquinamento ambientale *outdoor* e *indoor* e predisposizione genetica (Lòpez-Campos JL. 2008).

Negli ultimi decenni è stato registrato un progressivo aumento di asma e allergie, sia nei paesi più industrializzati del mondo occidentale, che nei paesi in via di sviluppo.

La prevalenza dell'asma e dei sintomi ad essa associati è stata oggetto di studio di numerosi gruppi di ricerca in tutto il mondo. Sebbene le differenze metodologiche tra questi studi, rendano difficile una comparazione diretta tra i risultati ottenuti dalle analisi epidemiologiche, il trend di aumento di prevalenza dell'asma e di altri 'disordini atopici' correlati, è stato validato in paesi molto diversi sia geograficamente che etnicamente (Pearce N., Douwes J. 2006).

Le variazioni osservate nella prevalenza dei sintomi di asma, rinocongiuntivite ed eczema, oscillano da 10 a 20 volte tra i diversi paesi ed hanno suggerito una grande influenza dei fattori ambientali sull'esacerbazione delle patologie allergiche.

Al fine di ottenere informazioni dalle indagini epidemiologiche effettuate, e di comparare la prevalenza delle patologie allergiche in più popolazioni, è stata recentemente istituita la terza fase del progetto ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*).

Questo studio, avviato nel 1992 (fase I), ha confrontato le prevalenze internazionali e regionali di asma, rinocongiuntivite allergica ed eczema atopico in bambini tra i 6 e i 7 anni e in adolescenti tra i 13 e i 14 anni, in 155 centri di 56 paesi di varie aree del mondo (Asher MI. 1995).

Tra i diversi centri sono state registrate ampie variazioni nella prevalenze delle suddette patologie; ad esempio, nel gruppo degli adolescenti, le percentuali di prevalenza oscillavano dall'1,6% al 36,8% per l'asma, dal 1,4% al 39,7% per la rinite allergica e dallo 0,3% al 20,5% per l'eczema.

Le differenze geografiche nella prevalenza delle tre patologie concordavano con le stesse tendenze osservate in un altro studio, l'ECRHS, condotto su soggetti adulti e su un più piccolo numero di centri e di paesi (Pearce N. 2000).

Il progetto ISAAC ha suggerito come la variabilità geografica dei sintomi, anche in gruppi simili sotto il profilo genetico, sia strettamente legata a fattori socioeconomici, climatici, alimentari ed ambientali. Pertanto, in alcuni dei centri partecipanti, negli anni 2000 è stata realizzata una seconda fase (ISAAC II) con lo scopo di identificare i fattori chiave responsabili delle differenze di prevalenza osservate.

Infine, la terza fase di ISAAC (ISAAC III) è stata svolta per la maggior parte nel 2002-2003 per confrontare, circa sette anni dopo la prima parte dello studio, la prevalenza delle stesse patologie, e riportarle in una 'mappa mondiale' globale che includeva 280 centri di 106 paesi diversi.

Parallelamente alle fasi I e III degli studi internazionali ISAAC, in Italia, sono stati avviati due progetti SIDRIA (Studi Italiani sui Disturbi Respiratori dell'Infanzia e l'Ambiente) con le stesse modalità, su un campione rappresentativo di circa 40.000 alunni delle scuole medie ed elementari di 13 centri sparsi sul territorio nazionale.

I dati epidemiologici emersi dallo studio ISAAC III sono di più complessa interpretazione. Nell'insieme, gli aumenti di prevalenza per l'asma, la rinocongiuntivite allergica o l'eczema sono due volte più frequenti delle diminuzioni, e sono osservati più spesso nei bambini piuttosto che negli adolescenti. L'incremento delle allergie è più netto per l'eczema nel gruppo dei bambini e per la rinocongiuntivite a qualsiasi età.

Al contrario, nei centri in cui era stata registrata una più alta prevalenza iniziale, l'asma negli adolescenti risulta in diminuzione piuttosto che in aumento (Asher MI. 2006).

Sebbene la prevalenza di asma bronchiale, rinite allergica ed eczema atopico risulti spesso correlata, tale associazione non è sempre fortemente significativa.

In alcuni centri infatti, è stata registrata un'elevata prevalenza per l'asma ma non per la rinite o per l'eczema e viceversa, probabilmente perché i fattori di rischio più importanti per l'insorgenza di disordini correlati, potrebbero non essere comuni, o potrebbero necessitare di differenti periodi di latenza (Pearce N. 2000).

Gli studi di popolazione effettuati hanno ulteriormente confermato l'enorme eterogeneità e complessità delle allergopatie respiratorie e la variabilità dei fattori che influiscono sulla storia naturale di queste patologie, evidenziando la necessità di adoperare approcci integrati per lo studio delle malattie complesse.

I dati riportati in letteratura sottolineano inoltre la stretta relazione tra predisposizione genetica e fattori ambientali nello sviluppo delle patologie respiratorie. L'influenza di fattori genetici è già accertata ed è considerata uno dei principali fattori di rischio: i figli di genitori allergici presentano un rischio del 60% di sviluppare allergopatie quando un genitore è allergico, ed addirittura dell'80% quando lo sono entrambi. Diversi studi effettuati su gemelli monozigoti e dizigoti confermano un tasso di concordanza più elevato nei primi rispetto ai secondi (Sarafino EP., Goldfedder J. 1995).

L'ereditarietà di tali patologie è stata globalmente stimata in un intervallo che va dal 36% (Nieminen MM. 1991) al 75% nei gemelli (Duffy DL. 1990). Risultano inoltre essere ereditabili i fenotipi associati alle allergopatie come il livello sierico totale delle IgE, valori elevati di conta degli eosinofili nel sangue e una variabile risposta a farmaci colinergici antispastici come l'istamina e la metacolina (Palmer LJ. 2000).

La conoscenza della genetica delle allergie respiratorie è considerevolmente aumentata negli ultimi decenni. Dal primo studio effettuato nel 1989 (Cookson WO. 1989), che correlava il locus cromosomico 11q13 all'atopia, sono stati pubblicati centinaia di lavori con lo scopo di identificare le variazioni genetiche responsabili delle basi patofisiologiche di questi disordini complessi.

Le malattie multifattoriali

Uno dei maggiori traguardi delle scienze biomediche nel ventesimo secolo è stata l'identificazione, attraverso studi di clonaggio posizionale, di varianti genetiche responsabili delle più note malattie mendeliane o monogeniche, come la fibrosi cistica o la Corea di Huntington.

Gli stessi studi di *linkage* o di associazione non si sono rivelati adeguati, per l'analisi delle malattie ad eziologia complessa, in cui la mancanza di un chiaro pattern di trasmissione ereditaria, l'elevata eterogeneità genetica o allelica e l'influenza dei numerosi fattori ambientali, rendono difficile una correlazione univoca tra genotipo e fenotipo.

Le patologie complesse o multifattoriali, come il cancro, le malattie cardiovascolari le patologie allergiche respiratorie, dipendono dalla presenza di più loci (o geni) di suscettibilità che hanno uno specifico impatto sul fenotipo, e dall'interazione con altri fattori, la cui frequenza e distribuzione è altamente variabile tra gli individui e nelle popolazioni.

Il termine "complesso" definisce sia i caratteri quantitativi, detti anche poligenici, che presentano un continuum di variabilità fenotipica (statura, peso corporeo, pressione sanguigna e il metabolismo) sia i caratteri qualitativi, in cui la manifestazione del fenotipo finale è determinata dall'interazione tra fattori ambientali e genetici, ognuno con uno specifico contributo (figura 1).

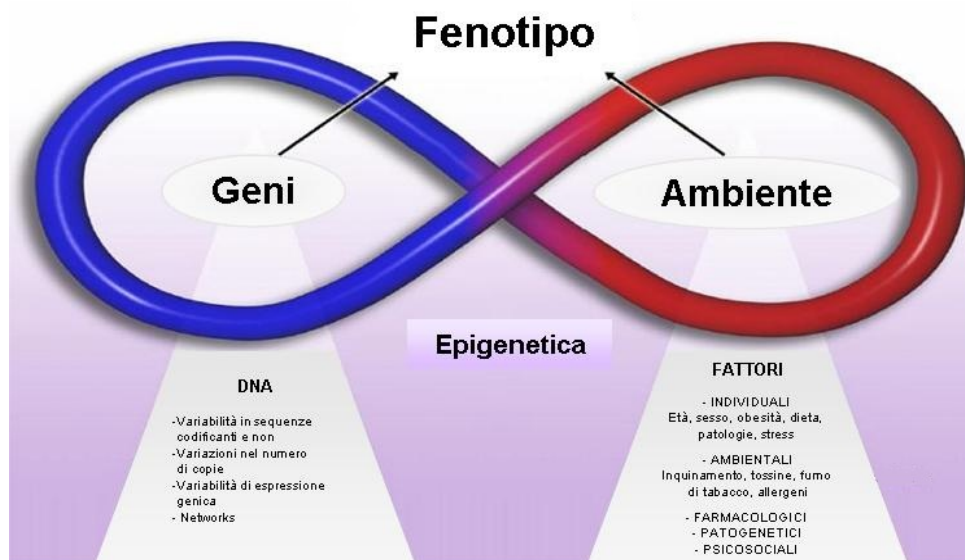


Figura 1. Contributo dei fattori genetici ed ambientali nella determinazione del fenotipo finale.

Studi di genetica effettuati su modelli animali, evidenziano l'incidenza dei fattori ambientali come determinanti di fenotipi complessi e dimostrano l'esistenza di una forte

interazione geni-ambiente. Da uno studio su 2448 topi geneticamente eterogenei, è stata riportata l'ereditabilità di 88 fenotipi complessi, classificati in immunologici, biochimici ed ematologici e rappresentativi di diversi modelli di malattie multifattoriali (asma, diabete mellito di tipo-2, obesità e ansia). La varianza fenotipica risultante dalle interazioni delle covarianti fisiologiche ed il *background* genetico, è risultata maggiore, rispetto al valore attribuito ad ogni singolo effetto ambientale o genetico, considerato separatamente (Valdar W. 2006).

Nelle patologie complesse infatti, l'interazione multipla tra geni diversi e l'incidenza dei molteplici fattori ambientali, contribuiscono in misura diversa all'espressione del fenotipo. Quanto minore è l'effetto di un determinato gene sul fenotipo, tanto maggiori sono le difficoltà di rilevamento degli effetti causali della variante in esame.

Per tali ragioni, la maggior parte degli studi di associazione genetica, non vengono spesso consistentemente replicati nell'ambito dello studio delle malattie multifattoriali.

E' necessaria un'indagine di tipo integrato, in cui la variante genetica sia correlata a specifiche manifestazioni fenotipiche, caratteristiche della condizione patologica. Tale approccio considera simultaneamente l'influenza di fattori biologici (di tipo epigenetico, epistatico, variazioni aplotipiche e dell'ambiente cellulare) e di fattori ambientali (occupazionali, stile di vita, infezioni, dieta), che interagiscono all'interno di ipotetiche "finestre di opportunità" determinando quindi, una vasta eterogeneità di fenotipi (figura 2).

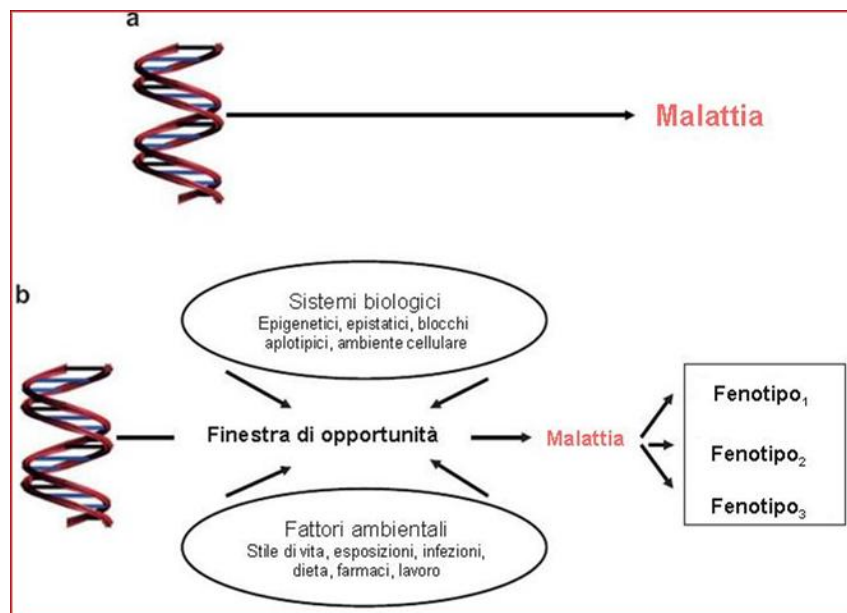


Figura 2. Diversi approcci per lo studio della genetica delle patologie. a) Nel modello statico, la sequenza di DNA è associata in modo lineare al rischio di malattia. b) Nel modello integrato, l'influenza di fattori ambientali e di sistemi biologici che interagiscono all'interno di specifiche finestre di opportunità, correla le variazioni di sequenza a molteplici fenotipi patologici.

Sulla base di questa eterogeneità, nasce la necessità di studi genetici finalizzati all'identificazione ed alla corretta classificazione di fenotipi ben distinti ed associabili alle patologie allergiche respiratorie.

Identificazione di varianti geniche nelle patologie complesse

Esistono tre principali approcci statistici per l'identificazione di geni o varianti geniche nello studio delle patologie complesse: 1) l'analisi di *linkage*, 2) lo studio di associazione e 3) l'*admixture mapping*.

In breve, l'analisi di *linkage* è un'analisi di segregazione familiare che permette di assegnare un gene o un locus ad una determinata regione cromosomica definita da un insieme di marcatori polimorfi (ad esempio i microsatelliti).

Se il marcatore genetico e la variante patologica sono in stretta vicinanza in un determinato punto del genoma, vengono trasmessi attraverso le generazioni (Bray MS. 2000).

Pertanto, tutti i membri di una famiglia affetti da una determinata patologia, ereditano lo stesso allele marcatore in *linkage* con l'allele responsabile del fenotipo patologico.

Quando le famiglie studiate sono abbastanza estese da poter dimostrare che la co-localizzazione tra il gene-malattia e il marcatore non è un evento casuale, allora i due loci (malattia e marcatore) sono detti in *linkage* (Risch NJ. 2000).

Tuttavia, le analisi di *linkage*, non sono altamente specifiche; esse delimitano una regione cromosomica (non un gene o una variante genica), che può contenere anche centinaia di geni, all'interno della quale si procede per la ricerca del gene candidato, attraverso successive indagini di *positional cloning* (Baye TM. 2010).

Nell'analisi delle patologie complesse si utilizza il *linkage* non-parametrico, uno studio che può essere effettuato su coppie di fratelli, su famiglie estese o su intere popolazioni (Strachan T., Read AP. 1999) senza che siano definiti dei parametri a priori (come il tipo di ereditarietà, la penetranza, la segregazione).

Il secondo approccio alternativo è lo studio di associazione, il cui scopo è quello di determinare se la presenza di una variante genica (in particolare SNPs) sia correlata all'aumento o alla diminuzione del rischio di sviluppare patologie complesse. Gli studi di associazione misurano la dipendenza statistica tra due o più variabili, confrontando le frequenze alleliche o genotipiche in un campione di individui che presentano una determinata patologia, e le frequenze dello stesso allele in un campione di controlli sani (caso-controllo) (McCarthy MI. 2008).

Alcuni problemi ricorrenti negli studi genetici di popolazione, sono connessi alla riproducibilità dei risultati ottenuti e derivano prevalentemente dalle differenze riscontrate tra le popolazioni in esame, dalla disomogeneità dei metodi utilizzati nella definizione del fenotipo e dall'eterogeneità genetica della patologia considerata (Steinke JW. 2008).

In ultimo, l'*admixture mapping* è un metodo utilizzato per l'identificazione di regioni cromosomiche contenenti tratti legati ad alleli ancestrali. Il mescolamento (*admixture*) avviene quando due o più popolazioni geneticamente differenti si fondono a formare una nuova popolazione. L'identificazione e la localizzazione di geni utilizzando nello studio una popolazione "admixed" è chiamata *admixture mapping*. Negli studi di *admixture mapping* i ricercatori combinano le informazioni di una popolazione nota con le informazioni genotipiche dei soggetti, utilizzando marcatori di informatività ancestrali (AIMs). Alcuni studi ad esempio, dimostrano che le patologie allergiche sono più diffuse tra popolazioni ancestrali provenienti dal West Africa rispetto quelle Europee (Higgins PS. 2005). La popolazione Afro-Americana è una popolazione eterogenea, per cui circa il 20% del materiale genetico identificato si ritrova anche in popolazioni ancestrali Europee.

L'associazione tra l'aumento del rischio di sviluppare l'asma e l'origine africana, e la natura eterogenea della popolazione Afro-Americana suggeriscono che l'*admixture mapping* potrebbe essere una strategia per la ricerca di geni legati all'asma nello studio di popolazioni geneticamente eterogenee (Parra EJ. 1998).

Il progetto HapMap

Nel corso degli anni, lo studio delle patologie complesse ha subito un grande evoluzione; l'analisi del singolo locus genico è stata superata da *screening* di più varianti contemporaneamente, dall'identificazione di insiemi di loci di suscettibilità o di geni associati ad una patologia.

Gli studi di associazione sono progrediti sotto diversi aspetti; è aumentato il numero di SNPs analizzati, sono state implementate le casistiche e i programmi statistici e bioinformatici per l'analisi, è stata presa in notevole considerazione la valutazione funzionale dell'espressione genica, delle cause ambientali ed epigenetiche (Cookson W. 2009).

Nel 2002 un team internazionale composto da 200 ricercatori di 6 paesi ha iniziato la costruzione di una mappa di alleli associati alle patologie più comuni, realizzando un *genome-wide SNPs database* facilmente accessibile online a tutta la comunità scientifica (sito <http://www.hapmap.org>).

Durante la prima e la seconda fase del progetto sono stati genotipizzati circa di 3,2 milioni di SNPs in 269 individui provenienti da 4 popolazioni differenti (Yoruban nigeriani (YRI), giapponesi di Tokyo (JPT), cinesi Han (CHB) e un gruppo di abitanti dello Utah con origini europee (CEU).

Nella terza fase, il progetto HapMap è stato ampliato, analizzando un numero minore di SNPs (circa 1 milione e 300 varianti), incrementando a più di 1000 il numero di soggetti e genotipizzando 7 nuove etnie (11 in totale): cinesi di Denver (CHD), indiani Guajarati di Houston (GIH), africani del sud-ovest degli Stati Uniti (ASW), Luhya (LWK) e Maasai (MKK) del Kenya, messicani di Los Angeles (MXL) e anche un gruppo di toscani (TSI).

Grazie a questa mappa dettagliata (1 SNP per circa 1000bp) si è compreso che il genoma viene ereditato in blocchi e non in punti, ed è stata fornita una guida per gli studi di *linkage-disequilibrium* e ricerca del gene candidato e di associazione *genome-wide* (Baye TM. 2010).

Studi di *linkage genome-wide*

Le prime fondamenta solide per la comprensione delle diversità genetiche tra gli individui, sono emerse grazie al completamento del Progetto Genoma Umano, che ha reso disponibile la sequenza dell'intero genoma, rivelando un'identità del 99.5% tra individui casualmente scelti all'interno di una popolazione. Il restante 0.5% del genoma umano, caratterizzato da SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), CNV (*copy number variation*), inserzioni, inversioni, delezioni e duplicazioni (Redon R. 2006), è soggetto a variabilità individuale e mostra cambiamenti all'interno della popolazione.

Tale tasso di variabilità interindividuale pari allo 0,5%, è responsabile dell'unicità dei tratti genetici che distinguono gli individui, incluse le differenze fenotipiche, le diverse risposte ad esposizioni ambientali, la predisposizione e la resistenza ad alcune patologie e le risposte individuali ai trattamenti farmacologici.

Negli anni più recenti, lo studio delle basi genetiche delle malattie complesse è stato rivoluzionato dai progressi tecnologici basati sulla tipizzazione genetica degli SNPs e sulla caratterizzazione di milioni di varianti nel genoma umano (Altshuler D. 2005).

Ciò ha reso possibile la determinazione genotipica simultanea di più di 500,000 SNPs nel genoma di un singolo individuo.

I progressi tecnologici degli ultimi anni, hanno fatto emergere, l'importanza degli studi di associazione con approccio *genome-wide*, che a differenza degli studi di *linkage* mediante *positional cloning*, non richiedono il reclutamento e l'analisi fenotipica di un grosso numero

di soggetti all'interno di una famiglia e hanno un maggiore potere statistico a parità di numero di soggetti.

L'approccio di tipo *Genome-Wide* (GWASs) permette di identificare, attraverso lo *screening* dell'intero genoma, le varianti geniche (per lo più SNPs, con un alto grado di eterozigotità) associate ad una determinata malattia, basandosi sui già noti metodi di associazione di tipo caso-controllo (*case-control studies*), o attraverso lo studio dei soli casi (*case-only studies*).

Sistemi di questo tipo permettono un'analisi molto più veloce ed accurata utilizzando tecniche di genotipizzazione *high-throughput* su piattaforme *array* che permettono l'analisi contemporanea di migliaia di SNPs, e mettono in relazione l'associazione con la patologia in esame o con altre caratteristiche.

Dal 2005 ad oggi le analisi GWASs hanno rivoluzionato lo studio dei fattori genetici coinvolti nell'insorgenza di malattie complesse, hanno permesso di identificare più di 150 fenotipi patologici e di associarli a centinaia di differenti loci genici nel genoma umano (Altshuler D. 2008, McCarthy MI. 2008).

Il primo studio GWASs è stato pubblicato su Nature nel Febbraio del 2007 (Sladek R. 2007) per la ricerca delle varianti di suscettibilità del diabete di tipo II.

In seguito sono stati effettuati numerosi studi GWASs su alcune patologie complesse tra cui l'asma bronchiale, l'artrite reumatoide, l'ipertensione, la psoriasi, implementando le piattaforme di genotipizzazione e le analisi statistiche e bioinformatiche.

I risultati ottenuti dagli studi GWASs rappresentano comunque un primo step di analisi. L'insieme dei dati forniti deve essere replicato e validato, sono necessarie ulteriori meta-analisi per determinare l'importanza delle varianti geniche considerate in popolazioni multiple.

Allo studio genetico va affiancato uno studio biologico-funzionale per comprendere il ruolo dei geni identificati e delle varianti geniche nella patogenesi delle malattie prese in analisi (Vercelli D. 2010). (figura 3)

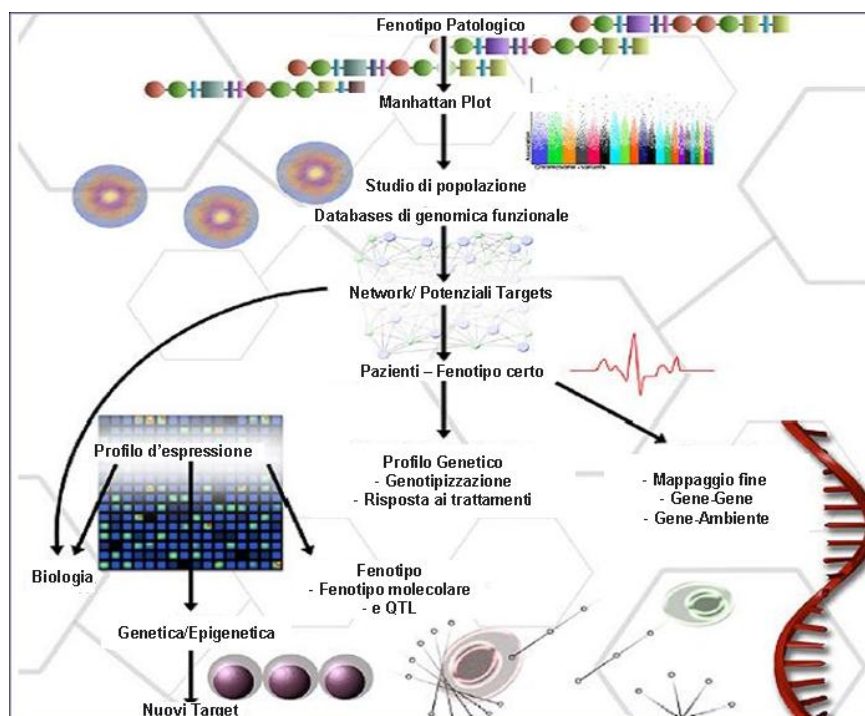


Figura 3. Dal fenotipo al genotipo. Panoramica di approcci genetici e genomici che possono essere utilizzati per lo studio delle patologie complesse.

L'integrazione e la correlazione di questi dati permetterebbe di costituire quadri di variazioni genetiche di una patologia, di indicarne contemporaneamente i loci coinvolti ed i geni mis-regolati permettendo di risalire più agevolmente ai *pathways* patogenetici responsabili.

Variazioni epigenetiche nelle patologie allergiche

Nella maggior parte delle patologie complesse non sono state identificate specifiche alterazioni geniche, tali da rappresentare di per sè, la causa principale della malattia. Evidenze di questo tipo confermano l'ipotesi, sempre più accreditata, che siano implicati meccanismi 'epigenetici' di regolazione del DNA, ovvero processi che non comportano cambiamenti nella sequenza nucleotidica, ma che determinano modificazioni fenotipiche ereditabili in grado di variare l'espressione genica (Goldberg AD. 2007, Bird A. 2007).

Le modificazioni epigenetiche sono da considerarsi eventi naturali ed essenziali per l'adattamento e l'evoluzione della specie.

Tra le più importanti alterazioni epigenetiche vi sono: la metilazione del DNA, l'aggiunta covalente di un gruppo metilico ad un residuo di citosina presente in un sito CpG (Klose RJ. 2006); le modifiche post-traduzionali come acetilazione, fosforilazione, metilazione,

sumoilazione o ubiquitinazione delle code amminoacidiche degli istoni (Kouzarides T. 2007); l'espressione aberrante di microRNAs in grado di legare l'mRNA *target*, degradarlo o modificarlo, e variare quindi l'espressione della proteina (Rodriguez A. 2004).

Complessivamente, questi tre principali meccanismi epigenetici, alterano l'interazione tra fattori di trascrizione e DNA, la stabilità dei trascritti, il *folding* del DNA, il posizionamento dei nucleosomi, il compattamento della cromatina e tutti i livelli di organizzazione nucleare, tanto da determinare, l'attivazione o il silenziamento di un gene (o di un set di geni) e regolarne finemente l'espressione.

Tali alterazioni hanno quindi un ruolo cruciale nel determinare i programmi trascrizionali di tutti i tessuti in differenziamento o già differenziati (Ho SM. 2010).

Nello specifico, la metilazione dei siti CpG e la modificazione degli istoni, sono due meccanismi strettamente dipendenti l'uno all'altro (figura 4).

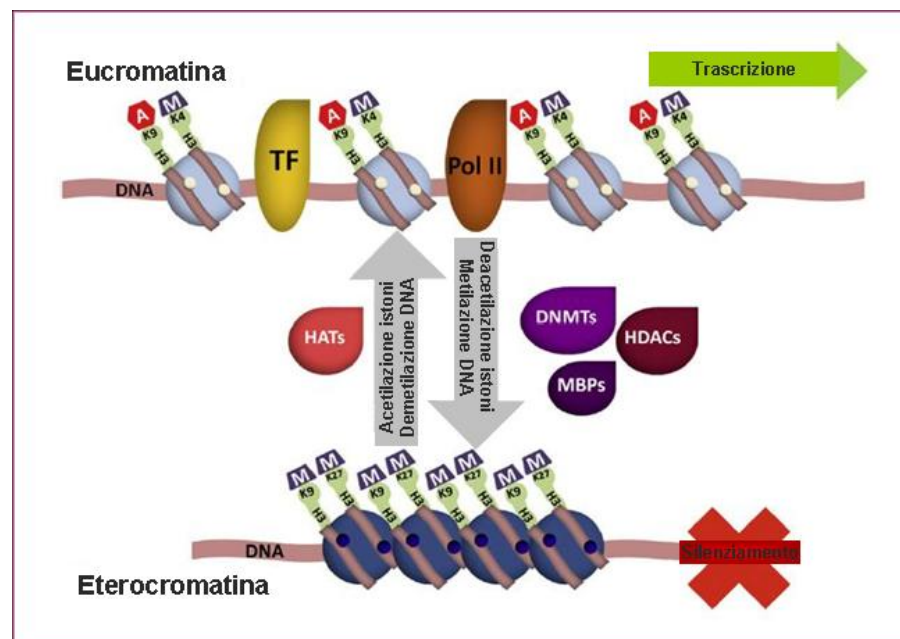


Figura 4. Contributo dei meccanismi di metilazione del DNA e delle modificazioni istoniche, nella regolazione dell'espressione genica.

Le isole CpG rappresentano soltanto l'1-2% del genoma umano e sono prevalentemente localizzate nelle regioni adiacenti ai promotori dei geni. L'ipermetilazione dei siti CpG nei promotori è comunemente associata al silenziamento trascrizionale, queste modifiche infatti, determinano una minore affinità dei fattori di trascrizione (Bogdanovic O. 2009) e un aumento dell'affinità di legame con alcune proteine che legano il DNA metilato, tra cui l'istone deacetil transferasi ed altri corepressori. Le modificazioni istoniche, causano variazioni nell'espressione genica indotte da rimodellamenti della cromatina nella regione promotore o nelle regioni

codificanti dei geni *target*; trasducono segnali extracellulari (*insulin-like growth factor-1*, Tiwari VK. 2008) in grado di attivare eventi genomici e mediano le interazioni coi fattori ambientali (Miller RL. 2008).

L'importanza e l'attualità di questo argomento risiede nel fatto che numerosi agenti tossici e sostanze chimiche, a cui siamo comunemente esposti e che contribuiscono alla patogenesi dell'asma, possono indurre alterazioni epigenetiche.

Fra gli inquinanti ambientali, considerati fattori di rischio per l'insorgenza delle allergie respiratorie, vi sono: metalli pesanti, pesticidi, tabacco, idrocarburi policiclici aromatici, materiale articolato, ormoni, allergeni *indoor* ed *outdoor*, sostanze radioattive, farmaci, virus, batteri e componenti della dieta (Ho SM. 2010).

Un altro meccanismo spesso coinvolto nella variazione dell'espressione genica è 'l'imprinting'; con questo termine si intende la condizione in cui uno dei due alleli è reso silente da un evento epigenetico: il problema si verifica se il gene espresso è mutato o contiene varianti che rendono l'organismo più vulnerabile a germi, agenti tossici o altri agenti inquinanti.

L'attuale conoscenza degli effetti che gli agenti ambientali epigeneticamente attivi hanno sulla patogenesi dell'asma è riassunta in figura 5.

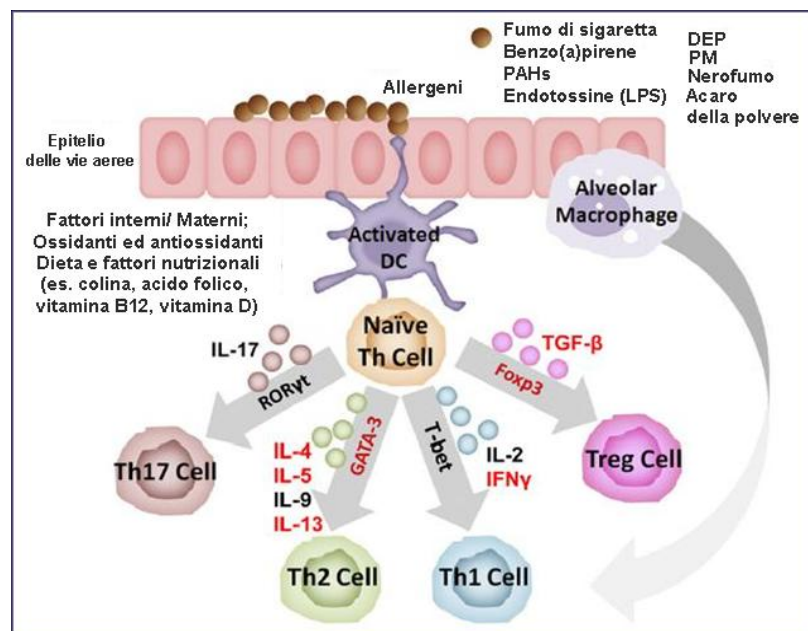


Figura 5. Effetti dei fattori ambientali ed attivazione della risposta immunitaria nelle patologie allergiche.

L'epigenetica è riconosciuta anche come un meccanismo chiave per il mantenimento dell'equilibrio Th2 in pazienti asmatici (van Panhuys N. 2008). L'esposizione agli allergeni scatena l'attivazione di una risposta immunitaria e induce il differenziamento dei linfociti Th

naive in linfociti Th2, che esprimono un *pattern* di citochine infiammatorie (IL4, IL5, IL13), responsabili della risposta allergica (Zhu J. 2008). Diverse evidenze sperimentali dimostrano che la polarizzazione del fenotipo Th2 è il risultato di rimodellamenti cromatinici indotti da cambiamenti epigenetici multipli, in geni che regolano il differenziamento in senso Th2 (Jones B. 2006, Young HA. 1994).

In conclusione, numerosi meccanismi epigenetici regolano una vasta gamma di geni associati alle patologie allergiche e soprattutto all'asma, contribuendo all'esacerbazione dei sintomi ed al mantenimento del fenotipo asmatico.

ASMA E RINITE

Epidemiologia

Gli studi epidemiologici effettuati confrontando la prevalenza di asma e rinite nelle diverse popolazioni, offrono l'opportunità di comprendere al meglio la relazione tra queste due condizioni patologiche.

La prevalenza di asma e rinite è in continuo aumento in tutto il mondo, una delle cause principali è considerata l'influenza dei fattori ambientali.

La rinite allergica sembra avere una prevalenza almeno tre volte maggiore rispetto l'asma bronchiale. Entrambe le patologie spesso coesistono nello stesso soggetto, l'asma è presente nel 20-50% dei pazienti affetti da rinite allergica e la rinite è presente nell'80% di individui che manifestano l'asma bronchiale (Demoly P. 2006).

Si ritiene inoltre che tali cifre siano sottostimate a causa della mancanza di un metodo standardizzato e rigoroso per la diagnosi di rinite allergica e spesso le forme lievi si manifestano con una sintomatologia persistente e talmente sfumata da non richiedere il consulto medico.

L'atopia ha un ruolo importante nella correlazione tra asma e rinite ma non ne costituisce un requisito fondamentale. In uno studio di coorte effettuato su una popolazione europea, la rinite è stata classificata come fattore di rischio indipendente per l'insorgenza dell'asma, sia in soggetti atopici che in quelli non-atopici (Leynaert B. 1999). La presenza di rinite persistente è uno dei maggiori fattori di rischio per l'insorgenza dell'asma, con *odds ratio* pari a 11 in soggetti atopici e pari a 17 nella popolazione non-atopica.

Se si accetta l'ipotesi secondo cui la presenza di rinite è una condizione pressochè perenne ed ubiquitaria nei pazienti con l'asma, è ragionevole considerare la popolazione asmatica come un sottogruppo di quella rinitica.

Definizione e aspetti clinici

I processi immunologici ed infiammatori che portano alla comparsa della rinite allergica e dell'asma bronchiale risultano quasi sovrapponibili. In figura 6 è riportata una rappresentazione schematica della stretta interrelazione tra rinite, rinosinusite e patologie bronchiali come: asma, bronco-pneumopatia cronica ostruttiva e bronchiectasia.

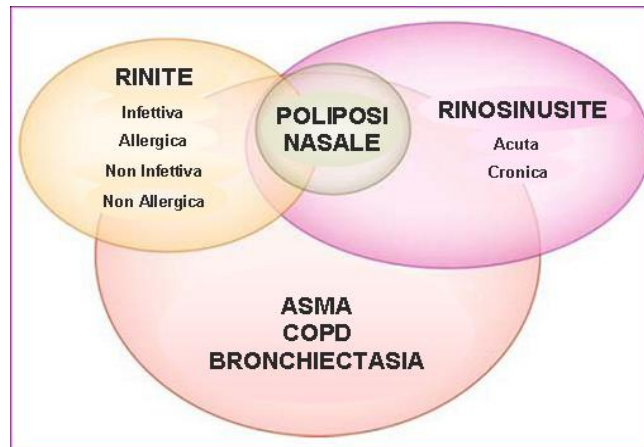


Figura 6. Illustrazione delle relazioni tra i fenotipi clinici delle più note patologie allergiche respiratorie.

Nella rinite allergica la flogosi interessa la mucosa nasale, mentre nell'asma colpisce la mucosa bronchiale. L'asma è una malattia cronica-infiammatoria delle vie aeree caratterizzata da ostruzione bronchiale, solitamente reversibile spontaneamente o in seguito alla terapia, da iper-reattività bronchiale e da un accelerato declino della funzionalità respiratoria. La rinite allergica è indotta da una reazione IgE mediata che si verifica in seguito all'esposizione ad uno o più allergeni verso cui il paziente risulta sensibilizzato (Bousquet J. 2008).

Le caratteristiche fisiologiche e cliniche di asma e rinite sono il risultato di un'interazione fra le cellule infiammatorie (mastociti, eosinofili, cellule T, macrofagi, neutrofili, cellule epiteliali), i mediatori dell'infiammazione e le citochine a livello della superficie epiteliale (Varga EM. 1999). E' stata ben documentata in soggetti allergici l'infiltrazione di linfociti T-*helper* esprimenti citochine di tipo Th2, sia a livello della mucosa bronchiale o nasale o ancora nel compartimento bronco-alveolare.

Alcuni meccanismi fisiopatologici alla base della malattia asmatica non sono così evidenti nella rinite allergica. Infatti nell'asma l'infiammazione delle vie aeree determina un rimodellamento strutturale accentuato, con disfunzione del muscolo liscio e interazione vie aeree-parenchima, e determinano un'iper-reattività bronchiale.

Da un punto di vista ontogenetico, la mucosa nasale dovrebbe essere maggiormente resistente ai processi infiammatori e più soggetta ad insulti ambientali costanti, rispetto quella bronchiale.

I meccanismi attivi a livello della mucosa nasale, tra cui l'aumentata espressione di recettori per fattori di crescita come c-erbB (Polosa R. 2000) o la presenza di inibitori delle metalloproteinasi di matrice (Shaida A. 2001), confermano un potenziamento della risposta epiteliale e una maggiore difesa agli insulti esterni, rispetto il compartimento bronchiale.

Numerose evidenze epidemiologiche e immunopatofisiologiche indicano che asma e rinite sono due patologie strettamente interconnesse, condividono meccanismi e risposte fisiologiche spesso analoghe, sebbene siano sempre da considerare come due disordini indipendenti. In questa relazione, la barriera nasale, svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi, proprio grazie alla sua localizzazione anatomica (figura 7).

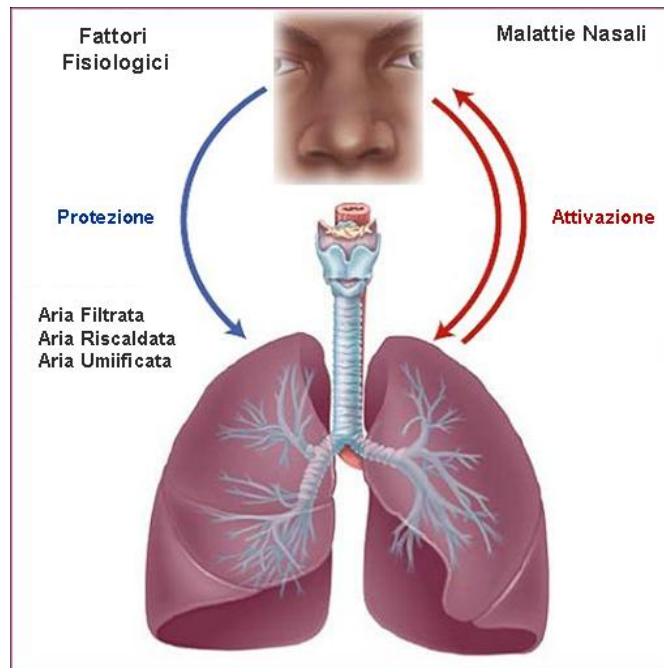


Figura 7. Duplice ruolo di difesa e di innesco dei meccanismi infiammatori da parte della barriera nasale.

Clinicamente l'asma, si manifesta con dispnea, respiro sibilante, tosse, senso di costrizione toracica, la cui intensità varia in rapporto all'entità dell'ostruzione bronchiale. La gravità delle manifestazioni cliniche dell'asma infatti, è in genere correlata all'entità dell'ostruzione bronchiale, ma può essere percepita in modo diverso da diversi individui o nelle diverse fasi della malattia (Bateman ED. 2008).

La rinite si presenta con sintomi caratteristici: modificazioni della secrezione nasale (rinorrea), starnuti, prurito nasale e ostruzione nasale. Anche nella rinite, come per l'asma, è presente ipereattività della mucosa nasale specifica e aspecifica (Bousquet J. 2008).

L'asma è una malattia molto eterogenea che sulla base di linee guida internazionali (Global Initiative for Asthma 2008 <http://www.ginasthma.org>.) è stata classificata in intermittente e persistente ed ulteriormente divisa in lieve, moderata o severa. La stessa classificazione è valida per la rinite allergica. La patologia definita intermittente comprende 2 quadri differenti: 1) sintomi sporadici per lunghi periodi di tempo; 2) episodi o periodi sintomatici anche rilevanti e prolungati intervallati da lunghi periodi di remissione.

Più recentemente, all'interno del programma "Severe Asthma Research Program" (NHLBI) è stata effettuata un'analisi ed una suddivisione gerarchica in *cluster* fenotipici (*unsupervised hierarchical cluster analysis*), di 726 soggetti affetti da asma severa, considerando 34 variabili fenotipiche (Moore WC. 2010).

I pazienti oggetto dello studio sono stati suddivisi in 5 macro-gruppi, prevalentemente classificati in base ai seguenti parametri: atopia, età di insorgenza dell'asma (esordio precoce o tardivo), funzionalità polmonare, uso di corticosteroidi orali, gravità dei sintomi e necessità di assistenza sanitaria.

Riassumendo, tutti i *clusters* elencati includono soggetti in cui è definita una condizione di asma grave, questi gruppi rispecchiano l'eterogeneità clinica dell'asma e chiarificano la necessità di nuovi approcci metodologici per la classificazione della patologia asmatica

Nei pazienti allergici la storia clinica è l'elemento diagnostico più importante, infatti comprende: l'attività professionale, la storia familiare del soggetto (ereditarietà), l'ambiente, le abitudini di vita (casa, arredamento della camera da letto, abitudine al fumo di sigaretta del soggetto e dei componenti del nucleo familiare), lo stato di salute generale (malattie pregresse o in atto e terapie farmacologiche), sintomi di esordio e quelli attuali.

Tuttavia negli studi genetici di analisi delle diverse condizioni asmatiche, è fondamentale l'identificazione dei differenti endofenotipi (*subphenotypes*) che ulteriormente caratterizzano l'eterogeneità delle manifestazioni asmatiche. Queste variabili, sono essenziali per l'analisi della severità della malattia asmatica e per classificare le gravità della patologia presa in esame.

Tra questi vi sono i cosiddetti fenotipi quantitativi, come il FEV1 (volume espiratorio forzato in 1 secondo) che si ottiene dall'analisi spirometrica ed è un parametro indicativo della funzionalità polmonare, o il PEF (controllo del picco di flusso espiratorio).

Ulteriori analisi effettuate per valutare la gravità dell'ostruzione polmonare o la risposta al trattamento farmacologico sono: il dosaggio delle IgE sieriche totali (PRIST) e delle IgE specifiche verso gli allergeni (RAST), la responsività ai test cutanei *in vivo* 'skin prick test' utilizzando estratti allergenici standardizzati tra i più comuni (Meyers DA. 2010).

BASI GENETICHE DELL'ASMA

Geni candidati e loci di suscettibilità

Le prime analisi di associazione per lo studio dell'asma bronchiale, utilizzavano l'approccio del gene candidato. I geni da testare venivano scelti a priori in base a diversi requisiti, quali: la localizzazione genomica, la funzione biologica, il coinvolgimento del gene in altre patologie spesso con fenotipi sovrapponibili.

Sebbene questo approccio limitava il numero di geni da poter includere in un'analisi di associazione, allo stesso tempo consentiva una scelta mirata dei geni candidati, con forte validità biologica e con un riscontro funzionale nella patologia (Baye TM. 2010). In figura 8 è riportata una rappresentazione grafica dei più importanti geni di suscettibilità legati all'asma, divisi in 4 gruppi principali: il gruppo 1 include i geni che codificano per proteine in grado di modulare direttamente gli effetti di alcuni fattori di rischio ambientali; nel gruppo 2 sono classificati alcuni geni, espressi in cellule epiteliali, responsabili di alterazioni della funzionalità della barriera; al gruppo 3 appartengono i geni che regolano la risposta infiammatoria atopica, inclusi quelli che controllano i livelli di eosinofili nel sangue; il gruppo 4 include i geni che modulano la risposta infiammatoria cronica e che sono espressi in modo tessuto specifico, in cellule muscolari lisce o fibroblasti.

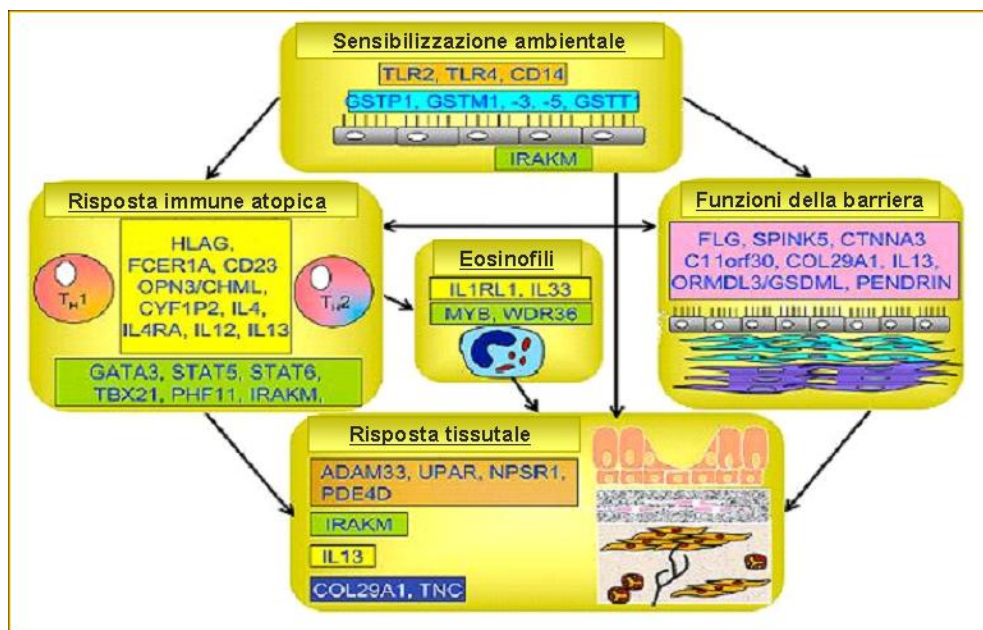


Figura 8. Geni di suscettibilità nelle allergopatie respiratorie.

Screening genomici hanno correlato i tratti legati all'asma a diverse regioni cromosomiche tra cui 2q, 5q, 6p, 11q, 12q e 13q (Hoffjan S., Ober C. 2002). Il cromosoma 5q, si è rivelato particolarmente interessante, perché questa regione è stata ritrovata associata all'asma in diversi studi di *linkage*; essa corrisponde ad una porzione ancestrale, evolutivamente conservata, contenente un *cluster* di geni (ADRB2, CD14, IL4, IL13) coinvolti nei meccanismi di infiltrazione degli eosinofili nelle vie aeree (Zhang Y. 1999) e più genericamente, nella patofisiologia dell'asma.

Ad esempio, il gene che codifica per il recettore B₂-adrenergico (ADRB2), è stato molto studiato ed associato all'asma sia per la sua localizzazione cromosomica, che per l'espressione tessuto specifica del recettore, identificato in cellule bronchiali della muscolatura liscia. Esso inoltre è coinvolto nella risposta ad alcuni farmaci, come l'albuterolo, ed in ultimo, le due più note mutazioni *missense* Arg16Gly e Gln27Glu sono state correlate ai sintomi persistenti connessi alla severità dell'asma (Hawkins GA. 2008).

Altri potenziali geni candidati, sono stati ritrovati in regioni cromosomiche significativamente associate all'asma, come il cromosoma 6p, in cui sono mappati i geni HLA-DRB1, HLA-DQB1, TNF e LTA. Allo stesso modo, sul cromosoma 12q, si ritrovano tre distinti loci corrispondenti ai geni VDR, STAT6 e NOS1, più volte associati all'asma, alla BHR e alla FEV1 (Guerra S., Martinez FD. 2008).

La ricerca di geni candidati sulla base di parametri quali la localizzazione genica o la funzione biologica, può 'nascondere' geni la cui funzione è ignota o che non sono direttamente associabili ai *pathways* legati all'asma; ciò accade perché, l'influenza di tali geni sul rischio di sviluppare la patologia asmatica è troppo bassa per risultare rilevante in uno studio di *linkage*.

Due esempi appartenenti a questo gruppo di geni sono ADAM33, localizzato sul cromosoma 20p13 e strettamente associato ad iperresponsività bronchiale (BHR) (Van Eerdewegh P. 2002) e GPRA, identificati mediante *positional cloning* prima che le proteine da essi codificate venissero funzionalmente associate all'asma.

I numerosi studi basati sulla ricerca dei geni associati all'asma, hanno portato all'identificazione di un enorme numero di varianti genetiche inconsistenti, di cui, ad oggi, è difficile valutare quali realmente contribuiscano alla manifestazione del fenotipo asmatico.

Applicando dei criteri restrittivi e dei parametri più stringenti di inclusione, si estrapola una lista di 43 geni strettamente associati al fenotipo asmatico.

In tabella 1 sono riassunti tutti i geni associati all'asma in almeno una popolazione di riferimento, non inferiore a 300 soggetti (150 casi e 150 controlli) e per i quali lo stesso SNP è stato replicato almeno in due popolazioni diverse (con l'eccezione di HAVCR1 e NOS3 presenti in una sola popolazione, ma confermati in studi di associazione diversi) (Weiss ST. 2009).

Table 1			
Gene	Ref seq.	Position	Total populations showing SNP association with asthma
ADAM33	chr20	3596621-3610738	9
ADRB2	chr5	148186349-148186381	5
CCL11	chr17	29636800-29639312	3
CCL24	chr7	75279052-75280969	2
CCL5	chr17	31222610-31231490	3
CD14	chr5	139991509-139993194	4
CH3L1	chr1	201414682-201422545	3
CTLA4	chr2	204440754-204446928	2
CX3CR1	chr3	39279990-39296531	2
CYSLTR2	chr13	48178952-48181499	3
DPP10	chr2	114916369-116318406	2
EDN1	chr6	12398645-12404761	3
FCER1B	chr11	59612713-59622590	9
GPR154	chr7	34664422-34856115	3
GSTP1	chr11	67107862-67110699	8
HAVCR1	chr5	156389015-156418548	1
IFN gamma	chr12	66834817-66839788	2
IL10	chr1	205007571-205012462	4
IL12b	chr5	158674369-158690059	2
IL13	chr5	132021764-132024700	8
IL4	chr5	132037272-132046267	11
IL4 R	chr16	27232752-27283599	7
INPP4A	chr2	98427845-98564716	2
IRAK-3	chr12	64869284-64928652	2
ITGB3	chr7	42686207-42745075	3
LTA	chr6	31648072-31650077	3
MYLK	chr3	124813835-125085839	2
NAT2	chr8	18293035-18303003	3
NOD1	chr7	30430675-30484790	4
NOS3	chr7	150319080-150342608	1
NPPA	chr1	11828363-11830422	2
ORMDL3	chr17	35330822-35337380	8
PAFAH	chr6	46780238-46811055	3
PHF11	chr13	48967802-49001117	4
PTGDR	chr14	51804181-51813191	5
TBXA2R	chr19	3545504-3557658	2
TGFB1	chr19	46528491-46551656	2
TLR4	chr9	119506431-119519587	2
TLR9	chr3	52230138-52235219	3
TLR10	chr4	38450647-38460984	2
TNF	chr6	31651329-31654089	17
UGB (CC10)	chr11	61943099-61947242	4
VDR	chr12	46521587-46585081	3

Tabella 1. Lista e posizione cromosomica di 43 geni associati al fenotipo asmatico.

Successive analisi di GWASs, condotte su larga scala, hanno consentito di superare i limiti tecnici derivati dalle associazioni di *linkage* o dall'approccio con geni candidati, massimizzando il potere statistico di tali indagini e rendendo possibile l'identificazione di nuovi geni o *pathways*, senza alcuna ipotesi a priori.

Locus 17q21 e ORMDL3/GSDML

Negli studi di GWASs, l'identificazione ad ampio spettro di un numero elevato di varianti predisponenti una patologia, fa diminuire il potere predittivo attribuito ad ogni singolo gene o variante genica implicata, con un rischio genotipico relativo che varia da 1,1 a 1,5 (Himes BE. 2009).

I primi loci di suscettibilità identificati per l'asma, contenenti i geni *ORM1-like 3* (*S. cerevisiae*) (ORMDL3) e *Gasdermin like* (GSDML) sul cromosoma 17q12-21.1, sono stati oggetto di *screening* in una meta analisi di 5 studi pubblicati sull'rs7216389, in 9 diverse popolazioni. I risultati hanno indicato per la patologia asmatica, valori di *odds ratio* pari a 1,44 con un intervallo di confidenza (CI) compreso tra 1,35 e 1,54 (Hancock DB. 2009).

In uno studio di associazione di Moffatt et al. pubblicato nel 2007, sono stati tipizzati 317.000 SNPs su 994 soggetti affetti da asma in età infantile e 1243 controlli non asmatici, provenienti da uno studio di *coorte* di famiglie inglesi e da uno studio caso-controllo tedesco (Moffatt MF. 2007).

Dopo le correzioni statistiche ed un controllo qualitativo dell'analisi effettuata, solo 7 SNPs, localizzati in una regione di 112-kb sul locus 17q21, risultavano conformi ai parametri soglia con FDR (*false discovery rate*) >1%. L'ulteriore validazione dei risultati è stata ottenuta genotipizzando 9 tra gli SNPs (con FDR>5%) ritrovati nel locus 17q21 ed associati all'asma, in 2320 soggetti (200 asmatici e 2120 controlli). Tra queste 9 varianti, 5 SNPs risultavano significativamente associati alla malattia asmatica con un *p-value* < .01.

Gli autori hanno dimostrato che, all'interno della regione 17q21, contenente gli SNPs marcatori in *linkage disequilibrium* con la patologia asmatica, era localizzato il gene ORMDL3, di cui si osservavano variazioni nell'espressione.

Al fine di integrare i dati dell'analisi genetica con l'aumento di espressione di ORMDL3, gli stessi autori, hanno valutato i livelli di trascritto di ORMDL3, in cellule linfoblastoidi trasformate con l'Epstein-Barr virus (EBV). L'aumento di espressione del gene, era infatti fortemente correlato ad alcuni SNPs già associati all'asma nell'analisi GWASs.

Tra questi SNPs è risultato statisticamente significativo l'rs7216389 (*p-value*<10x10⁻²²) localizzato sul gene GSDML, limitrofo ad ORMDL3; tale SNP è stato considerato, in altri studi sperimentali, variante causale dell'alterazione dei livelli di trascritto di ORMDL3 (Holloway JW. 2008).

Ulteriori indagini saranno necessarie al fine di caratterizzare meglio questa regione putativa del genoma, in cui anche l'espressione del gene GSDML sembra essere co-regolata da alcuni degli SNPs di interesse (Holloway JW. 2010). Il gene GSDML appartiene ad una famiglia di proteine associate al cancro contenenti "gasdermin-domains" e coinvolte nella patogenesi tumorale .

Altri importanti studi hanno replicato l'associazione tra alcune varianti nel cromosoma 17q21, principalmente l'rs7216389, e l'asma infantile in popolazioni etnicamente molto diverse, tra cui: nord-americani (Sleiman PM. 2008), scozzesi (Tavendale R. 2008), franco-

canadesi (Madore AM. 2008), afro-americani, portoricani, messicani (Galanter J. 2008) e giapponesi (Hirota T. 2008).

La regione cromosomica 17q21 e soprattutto l'associazione tra le varianti geniche di ORMDL3 and GSDML sono state ulteriormente indagate in uno studio francese che ha analizzato 36 SNPs in 1511 soggetti asmatici; tra questi SNPs, 11 risultavano significativamente associati all'asma ed in particolare tre polimorfismi (rs8069176, rs2305480, and rs4795400) presentavano un'associazione forte ($P < 0.001$) con l'asma (Bouzigon E. 2008).

ORMDL3 appartiene ad una nuova famiglia di geni (ORMDL) con funzione ancora ignota, altamente conservati negli eucarioti, dal lievito ai mammiferi.

Molte delle specie studiate hanno più di un membro appartenente a questa famiglia genica: *S. cerevisiae* e *A. thaliana* contengono due geni ORMDL, mentre nei vertebrati ne sono presenti tre copie. Al contrario in *Encephalitozoon*, *Drosophila* e *Ciona* è presente un solo gene ORMDL, mentre, nessuna sequenza con omologia superiore al 30%, è stata ritrovata in *Caenorhabditis elegans*.

I tre geni paraloghi identificati nell'uomo e nella maggior parte dei vertebrati (ORMDL1, ORMDL2 e ORMDL3) mostrano un'identità amminoacidica di circa l'80%, mentre, più del 95% di omologia, è stata trovata tra i geni ortologhi di uomo e topo.

Nel genoma umano i tre geni ORMDL1, ORMDL2, e ORMDL3 mappano rispettivamente nelle regioni cromosomiche 2q, 12q e 17q.

Analisi di allineamento tra proteine di specie diverse hanno mostrato la presenza di un segmento amino-terminale più esteso di circa 20-60 residui amminoacidici per le proteine ORM di lievito in relazione a quelle ritrovate negli animali. I residui conservati della proteina sono raggruppati nel segmento mediale della catena polipeptidica, probabilmente a livello di un importante dominio funzionale.

Gli studi di allineamento hanno inoltre identificato 4 domini idrofobici e dalle analisi si riconoscono anche delle putative sequenza transmembrana. A supporto di queste osservazioni esperimenti di localizzazione delle proteine ORMDL umane, fuse con la proteina GFP, hanno confermato la presenza di ORMDL a livello subcellulare, ancorata al reticolo endoplasmatico. Questi dati non possono far escludere che l'overespressione della proteina potrebbe influenzare il traffico intracellulare e i meccanismi di *folding* proteico (Hjelmqvist L. 2002).

Sebbene poco si conosca sulla funzione di questa proteina, studi di ORMDL in lievito hanno suggerito che i doppi *knockouts* del gene, crescono più lentamente e sono altamente sensibili ai composti tossici come il DTT o la tunicamicina che inducono l'accumulo di

proteine non correttamente ripiegate nel lume del reticolo endoplasmatico (Hirota T. 2008). La risposta cellulare a questo tipo di stress porterebbe eventualmente all'attivazione di diversi *chaperones* o cofattori del reticolo endoplasmatico, confermando quindi l'ipotesi di coinvolgimento di ORMDL nei meccanismi di *folding* proteico (Patil C., Walter P. 2001).

Variabilità genetica in enzimi detossificanti: sistema GST

Dagli studi genetici di popolazione eseguiti in passato, emerge spesso come molte delle associazioni non siano state confermate in popolazioni differenti.

Screening di questo tipo devono essere considerati sempre come piccole parti di interazioni complesse tra ambiente e geni, di interazioni tra geni diversi e di modificazioni epigenetiche del genoma (Steinke JW. 2008).

Numerosi fattori ambientali, in grado di indurre flogosi delle vie aeree, svolgono un ruolo predominante nella sensibilizzazione alla malattia allergica, e sono un elemento fondamentale in grado di determinare l'ostruzione bronchiale. Tra questi: l'esposizione ad allergeni alimentari e pollini, l'esposizione a fattori adiuvanti non specifici come il fumo di tabacco (Goodwin RD., Cowles RA. 2008), l'inquinamento atmosferico urbano (Kim JJ. 2008) e le infezioni respiratorie virali (Mohapatra SS., Boyapalle S. 2008).

Per questi motivi, è importante includere l'analisi ulteriore di polimorfismi in specifici geni che sono stati studiati e caratterizzati per il loro coinvolgimento nell'interazione tra organismo vivente ed ambiente.

Diversi studi hanno valutato l'influenza della variabilità genetica degli enzimi detossificanti sul rischio di insorgenza dell'asma, dimostrando che la suscettibilità ai fattori di rischio ambientali e il possibile aumento del rischio di sviluppare una patologia sono dovuti alla variabilità individuale della risposta metabolica, poiché la diversa efficienza dei meccanismi di detossificazione cellulare è direttamente associata con la suscettibilità individuale agli agenti tossici ambientali.

In questo ambito, le ricerche sulle Glutathione S-Transferasi (GST) potrebbero aiutare a comprendere le dinamiche di alcune patologie multifattoriali.

Le glutathione S-transferasi (GSTs) sono una famiglia di isoenzimi detossificanti di fase II che catalizzano la coniugazione di substrati elettrofilici al glutathione, facilitano le risposte cellulari agli stress ossidativi e sono coinvolti nella detossificazione di idrocarburi policiclici aromatici presenti negli inquinanti ambientali (figura 9) (Ketterer B. 2001).

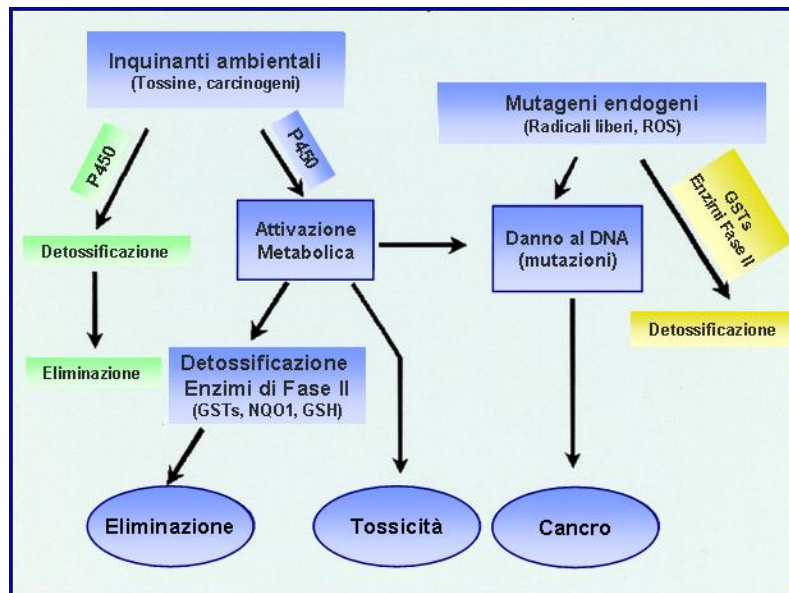


Figura 9. Ruolo delle GSTs nei meccanismi di risposta agli stress ambientali.

Le GST dimeriche citosoliche sono presenti in tutte le classi di vertebrati e invertebrati perché svolgono un ruolo chiave nella biotransformazione degli xenobiotici elettrofili. Questi enzimi sono codificati da 16 geni, e suddivisi in almeno 8 classi: *alpha*, *kappa* (mitocondriale), *mu*, *pi*, *sigma*, *theta*, *zeta*, *omega*. A queste se ne aggiungono altre denominate: *beta*, *delta*, *epsilon*, *lambda*, *phi* e *tau*, identificate in batteri, insetti e piante (Sheehan D. 2001. Edwards R., Dixon DP. 2004).

Le varie isoforme sono state identificate in base alla risposta ad anticorpi monoclonali, ad inibitori specifici e al valore del punto isoelettrico, caratteristico di ogni classe. Nonostante la bassa omologia di sequenza tra le varie classi, la struttura terziaria e quaternaria sono estremamente conservate (Micaloni C. 2003).

E' stato ipotizzato che alterazioni nei geni GST possano modificare la capacità delle cellule degli epitelii respiratori di detossificare i composti dannosi, modulando i processi infiammatori e la normale fisiologia del polmone.

Gli studi genetici del sistema GST si sono principalmente focalizzati su due delezioni, rispettivamente nei geni GSTM1 e GSTT1, che determinano la perdita di funzionalità dell'enzima (Bolt HM., Thier R. 2006).

Un altro polimorfismo oggetto di numerosi studi di associazione, considerato un fattore di rischio per l'insorgenza dell'asma (Aynacioglu AS. 2004), è la variante 313A>G nell'esone 5 del gene GSP1, che determina la sostituzione di un'isoleucina con una valina nel codone 105 della proteina. Tale residuo è localizzato in prossimità del sito idrofobico di legame con il substrato elettrofilo ed è stato dimostrato, che la proteina polimorfica, presenta un'alterata affinità per il substrato con conseguente diminuita efficienza catalitica (Watson MA. 1998).

Come documentato da uno studio effettuato da Gilliland e colleghi, tra le principali fonti di inquinamento atmosferico, il materiale particolato emesso da motori diesel è responsabile, assieme a fattori ambientali come gli allergeni, delle fasi di sensibilizzazione e di esacerbazione di patologie allergiche delle vie respiratorie prevalentemente a causa della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le GSTs sono enzimi in grado di metabolizzare i ROS accumulati a livello intracellulare e di detossificare dagli xenobiotici presenti nel particolato ambientale.

I ricercatori confermano l'ipotesi sperimentale secondo cui, i genotipi nulli di GSTM1, GSTT1 e la variante nel codone I105V del gene GSTP1, possano essere regolatori chiave degli effetti adiuvanti delle particelle diesel (DEPs) sulla risposta allergica (Gilliland FD. 2004).

ALLERGIE E AMBIENTE

Inquinanti ambientali e pollini

Studi epidemiologici hanno ampiamente dimostrato che l'asma allergico-bronchiale insorge per una convergenza di cause sia genetiche ereditarie, sia ambientali (allergeni, inquinanti atmosferici ed infezioni) che agiscono soprattutto come fattori scatenanti la malattia in individui geneticamente predisposti (Cookson W. 1999).

Molti allergeni ed agenti in grado di indurre flogosi delle vie aeree, giocano un ruolo predominante nella sensibilizzazione alla malattia allergica, e sono un elemento fondamentale in grado di determinare l'ostruzione bronchiale. Tra questi ricordiamo: gli allergeni alimentari ed inalanti, i fattori adiuvanti non specifici come il fumo di tabacco (Goodwin RD., Cowles RA. 2008), l'inquinamento atmosferico urbano (Kim JJ. 2008) e le infezioni respiratorie virali (Mohapatra SS., Boyapalle S. 2008).

Negli ultimi 30 anni è stato registrato un progressivo e cospicuo aumento di incidenza delle patologie allergiche dell'apparato respiratorio (Lòpez-Campos JL. 2008), soprattutto nei paesi occidentali più industrializzati. In particolare, si è osservato che, gli individui che vivono in aree urbane e con elevato traffico veicolare, hanno una maggiore probabilità di sviluppare allergopatie respiratorie, rispetto a coloro che vivono nelle aree rurali (Horak F. Jr. 2002).

Studi sulle emissioni veicolari, condotti prevalentemente su studenti, hanno dimostrato che la distanza da strade molto trafficate ed il tipo di traffico (automobili o mezzi pesanti), sono fattori di rischio significativi per l'insorgenza del *wheezing* in età infantile. Infatti, bambini che abitano vicino depositi di autobus o camion hanno una maggiore prevalenza di *wheezing* rispetto a bambini esposti in misura minore alle stesse inalazioni (Gauderman WJ. 2005).

Gli effetti dell'inquinamento ambientale sulle malattie bronchiali dipendono dal tipo di contaminante e dalla sua concentrazione nell'aria, dalla durata dell'esposizione, dalle condizioni respiratorie degli individui esposti e dall'interazione tra inquinanti atmosferici di origine chimica ed aeroallergeni, come pollini o spore fungine. L'esposizione ambientale ai contaminanti aerei, rappresenta un fattore chiave tra i determinanti dell'asma e della rinocongiuntivite (Reid CE. 2009).

Tra le particelle organiche che costituiscono il particolato biologico aerodisperso (detto aerospora), hanno particolare importanza allergologica alcuni tipi di pollini.

Le allergie da pollini o pollinosi sono patologie causate dall'inalazione di allergeni aerodiffusi; esse si manifestano in determinati periodi dell'anno in relazione alle condizioni

metereologiche, in soggetti geneticamente predisposti e prevalentemente in età infantile (Reid CE. 2009).

Il polline è il gametofito maschile delle Spermatofite. Il granulo pollinico è costituito da un protoplasma contenente un nucleo vegetativo e uno o più nuclei generativi, ed è rivestito da una parete rigida composta da una parte interna, l'intina, e da una esterna, l'esina. La sporopollenina è il componente principale della parete esterna, conferisce resistenza all'attacco di patogeni e di agenti fisici o chimici e favorisce la conservazione per tempi molto lunghi (Edlund AF. 2004).

Il trasporto dei granuli pollinici può avvenire per mezzo di: vento (dispersione anemofila), acqua (idrocora) ed insetti (entomofila). Le specie vegetali anemofile producono pollini in grandi quantità, leggeri (rilasciati dopo completa disidratazione) e di ridotte dimensioni con un diametro compreso tra meno di 10 ed oltre 200 micron (Knox B., Suphioglu C. 1996).

Quando le cellule polliniche entrano in contatto con una superficie umida, assorbono acqua per osmosi e vanno incontro a rapidi cambiamenti metabolici e morfologici. Gli allergeni dei granuli che sono situati nel rivestimento esterno del polline o nel citosol cellulare, vengono rapidamente rilasciati all'esterno quando il granulo è idratato.

Le mucose nasali o congiuntivali sono ambienti umidi ideali per il rilascio degli allergeni pollinici, esse sono considerate siti d'elezione per l'introduzione degli allergeni e per l'inizio dei sintomi tipici della pollinosi (D'Amato G. 2007).

Un'efficace sistema di prevenzione delle allergie da pollini è l'analisi dei periodi di impollinazione. In Europa ad esempio, il principale periodo di produzione del polline comprende la primavera, l'estate e l'inizio dell'autunno, con picchi diversi in relazione alla specie vegetale e alla distribuzione sul territorio (D'Amato G. 2007).

La *Parietaria judaica*

Il clima caratteristico dell'area Mediterranea, costituito da inverni non rigidi ed estati secche, determina una vegetazione che consiste soprattutto di *Oleacee*, *Cupressacee* ed *Urticacee*. La famiglia delle *Urticacee* riveste importanza allergologica quasi esclusivamente per il genere *Parietaria*, costituito da piante erbacee che crescono prevalentemente a ridosso di muri, molto diffuse in diversi paesi europei ed extraeuropei e soprattutto nelle zone costiere dei paesi che si affacciano sul mediterraneo come Italia, Spagna, Grecia, Albania, Francia (D'Amato G. 1998).

Sia la *Parietaria officinalis* che la *Parietaria judaica* sono considerate piante allergeniche responsabili di numerosi casi di pollinosi (Colombo P. 2003).

Nelle regioni meridionali ed insulari il periodo di pollinazione è spesso bifasico con una prima fase che inizia già a febbraio-marzo, raggiunge un massimo in aprile-maggio e termina a luglio e una seconda fase, più ridotta, nei mesi di settembre-ottobre. In questi periodi, la più elevata frequenza di pollinosi causata da *Parietaria*, si manifesta in soggetti tra i 10 ed i 30 anni.

Il granulo di *Parietaria judaica* ha dimensioni pari a 13-25 micron. La caratterizzazione e l'analisi delle molecole allergeniche del polline di *Parietaria judaica* ha permesso l'identificazione di 9 antigeni, di peso molecolare compreso tra 10 e 80 kDa, capaci di legare le IgE sieriche umane. Quattro di essi sono stati classificati come 'allergeni maggiori'. Il primo studio incentrato sull'isolamento e sul sequenziamento proteico di tali allergeni è stato condotto da Ayuso et al. ed ha messo in luce l'esistenza di due isoforme dell'allergene Parj 1, con peso molecolare rispettivamente di 13 e 10,5 kDa. Questi peptidi, pur essendo indipendenti, presentano omologie di sequenza N-terminale ed hanno determinanti antigenici comuni (Ayuso R. 1993). Successivamente, grazie alla costruzione di librerie di espressione dei cDNA degli allergeni di Pj, è stata ottenuta una più dettagliata analisi delle sequenze di Parj 1 e Parj 2.

Duro et al. hanno dimostrato che due specifiche isoforme di Parj 1 e Parj 2 oltre ad essere in grado di legare le IgE sieriche, sono capaci di indurre il rilascio di istamina (Duro G. 1997., Duro G. 1996). Analisi di analogia con sequenze proteiche già presenti in banche dati, hanno mostrato che gli allergeni maggiori di Pj appartengono ad una famiglia proteica composta da proteine vegetali in grado di trasportare molecole lipidiche attraverso le membrane, dette nsLTP (*non specific lipid transport protein*), coinvolte nei meccanismi di difesa contro i patogeni e gli stress ambientali (Asturias JA. 2003).

La conoscenza della struttura 3D ha consentito di affermare che il determinante antigenico Parj 1 è una sequenza contenuta nei primi 30 residui amminoacidici della molecola e che tale sequenza presenta omologie con la medesima regione di Parj 2 (Colombo P. 1998). Tra le molecole del polline di Pj è stato possibile individuare la presenza di un enzima ad attività proteolitica, l'aminopeptidasi Pj, che svolge un ruolo importante nell'alterazione dell'integrità delle barriere epiteliali e quindi nella fase di sensibilizzazione dell'individuo.

Come recentemente dimostrato infatti, la peptidasi Pj induce il distacco *in vitro* di monostrati di cellule di epitelio delle vie aeree, agendo specificatamente sull'occludina delle giunzioni strette e sulla E-caderina delle giunzioni aderenti; favorisce il trasporto degli altri

allergeni del polline oltre la barriera epiteliale, degrada peptidi regolatori del tono broncomotore, (peptide vasoattivo intestinale, sostanza P, bradichinina ed angiotensina I) causando broncocostrizione in soggetti asmatici (Cortes L. 2006).

I granuli pollinici non sono solamente *carriers* di molecole allergeniche di tipo proteico, in ambiente umido essi rilasciano composti di natura lipidica dotati di attività biologiche rilevanti nell'ambito delle reazioni allergiche.

Alcuni studi recenti hanno dimostrato che l'interazione tra aeroallergeni, inquinanti ambientali e malattie allergiche respiratorie è complessa, e che i contaminanti ambientali, non solo svolgono un ruolo chiave nell'eziologia di alcune allergopatie respiratorie, ma possono anche modificare gli effetti degli aeroallergeni su tali patologie. D'amato e collaboratori hanno ipotizzato che la ragione dell'incremento delle malattie allergiche nelle aree urbane potrebbe essere dovuta al ruolo degli inquinanti ambientali nella mediazione degli effetti degli aeroallergeni sulla salute degli individui predisposti. Gli effetti infiammatori dei PM (*particulate matter*) e l'interazione con gli allergeni del polline permettono una più facile penetrazione di queste sostanze nelle vie aeree; i PM aumentano il rilascio di antigeni da parte dei granuli pollinici che scatenano la reazione allergica; inoltre essi assorbono fisicamente sulla loro superficie i granuli prolungando la ritenzione dei granuli pollinici all'interno delle vie aeree dopo l'inalazione.

PM e DEPs: caratteristiche generali

Le particelle aerodisperse inalabili (PM; *Particulate Matter*) sono una miscela di sostanze organiche e inorganiche solide e/o liquide, variabili per massa, dimensione e composizione, in relazione alla diversa origine e alle condizioni meteorologiche. Le particelle inalabili, in grado di raggiungere le vie respiratorie inferiori, sono suddivise in tre frazioni granulometriche: *coarse*, fine ed ultrafine (D'Amato G. 2000). La frazione *coarse* più grossolana (PM₁₀), è costituita prevalentemente da particelle minerali di diametro compreso tra 2,5 e 10µm, deriva principalmente da processi d'erosione del suolo e delle rocce, e presenta composizione variabile a seconda della geologia del luogo. La frazione fine PM_{2,5} (tra 0,1 e 2,5µm), è composta da una miscela di particelle carboniose che derivano da processi di combustione (principalmente da emissioni di motori diesel) e da sali generati da reazioni fotochimiche in atmosfera (solfati e nitrati parzialmente neutralizzati). La componente carboniosa è costituita da aggregati di carbonio elementare ed organico su cui sono adsorbiti metalli (Pb, Cd, V, Ni, Cu, Zn, Mn, Fe), composti organici e contaminanti biologici.

La frazione ultrafine $PM_{1,}$ è composta da particelle carboniose con diametro di circa 0,01-0,1 μ m e derivata principalmente da emissioni diesel (DEPs). Le particelle ultrafini costituiscono la frazione numericamente più rilevante del PM_{10} e possono aggregarsi contribuendo in parte alla formazione delle particelle fini (D'Amato G. 2010).

I livelli di PM in atmosfera possono essere espressi secondo tre diversi parametri: la massa, la superficie e il numero di particelle per unità di volume. La dimensione delle particelle è inversamente proporzionale all'efficienza di deposizione totale e alla ritenzione polmonare, con una chiara tendenza del particolato ultrafine a raggiungere livelli elevati di deposizione periferica.

Le particelle della frazione *coarse* infatti, si depositano con maggiore efficienza nelle regioni naso-faringea e tracheo-bronchiale, dove vengono rapidamente rimosse mediante *clearance* mucociliare (D'Amato G. 2005). Le particelle fini e ultrafini penetrano più profondamente e si depositano nelle regioni alveolari e in distretti in cui la rimozione da parte dei macrofagi è estremamente più lenta.

Il materiale particellare depositato nell'apparato respiratorio può interagire direttamente con neurorecettori presenti nel naso e nelle vie respiratorie superiori, oppure provocare indirettamente una risposta, tramite l'interazione con i diversi tipi cellulari presenti nel polmone, principalmente cellule epiteliali e macrofagi (D'Amato G. 2000).

Alcuni studi hanno caratterizzato il materiale di origine biologica associato alle particelle, comprendente virus, batteri, endotossine, spore, pollini e frammenti cellulocici. E' stato dimostrato che particelle emesse da motori diesel hanno la capacità di legare frammenti di polline e allergeni comuni negli ambienti *indoor* e potrebbero, perciò, sia contribuire a mantenere un'elevata concentrazione degli allergeni nell'aria, sia rappresentare un possibile veicolo per gli allergeni verso le vie polmonari.

Per tali ragioni, negli ultimi anni, lo studio degli effetti dei PM sulla salute respiratoria è stato incentrato sull'analisi dei DEPs e dei loro componenti principali, gli idrocarburi policiclici aromatici (PAHs). I DEPs costituiscono la maggior parte del materiale particolato presente in atmosfera, equivalgono ad una frazione pari al 90% dei PM presenti soprattutto nelle grandi città (Shah SD. 2004), sono composti da particolato fine ed ultrafine, ma possono associarsi a formare aggregati di dimensioni differenti.

Il particolato che si deposita sulla mucosa delle vie aeree ha una natura idrofobica, i PAHs agevolano la rapida diffusione delle particelle attraverso le membrane cellulari e il successivo legame ai recettori citosolici. Ne consegue, un'attivazione delle funzioni nucleari che

determina cambiamenti nella crescita cellulare e nei programmi di differenziamento (Yun YP. 2005).

Effetti sulla salute respiratoria

Studi epidemiologici condotti negli ultimi dieci anni hanno mostrato una probabile associazione tra esposizione ambientale al materiale particolato aerosospeso inalabile e una serie di effetti sulla salute osservati nella popolazione (Künzli N. 2000). Gli indici presi in esame sono stati: la diminuzione della funzionalità polmonare, l'aumento della sintomatologia respiratoria, il peggioramento delle malattie polmonari croniche, l'aumento dei ricoveri ospedalieri e di mortalità per cause polmonari e cardiovascolari (Dockery DW. 2007), l'aumento dell'incidenza di attacchi asmatici e di infezioni polmonari (McCreanor J. 2007). Tali complicanze, sembrano essere direttamente correlate all'esposizione acuta a concentrazioni relativamente basse di polveri inalabili. Gli studi epidemiologici hanno preso in esame l'associazione tra mortalità totale e livelli di PM₁₀ in diverse zone geografiche e quindi in condizioni di esposizione qualitativamente dissimili.

I risultati ottenuti, utilizzando vari indici di esposizione (polveri sospese totali, PM₁₀, PM_{2.5}, fumo nero '*carbon black*'), hanno mostrato una sorprendente omologia per siti urbani e rurali ed hanno consentito di ipotizzare che la frazione fine del PM₁₀ potrebbe essere responsabile degli effetti polmonari, mentre la frazione *coarse*, sarebbe soprattutto coinvolta nell'aggravamento delle malattie asmatiche e nell'aumento delle patologie respiratorie (Yeatts K. 2007). Altri studi suggeriscono che le emissioni autoveicolari potrebbero essere implicate nell'induzione degli effetti sulla salute e che un ruolo significativo potrebbe essere svolto dalle particelle ultrafini (Burr ML. 2004).

La rilevanza tossicologica di questi parametri è oggetto di studio, in quanto ad una diversa granulometria e composizione chimica potrebbero corrispondere effetti diversi, in relazione sia alla diversa deposizione lungo le vie respiratorie, da cui dipende l'effettiva dose di esposizione, sia alla diversa reattività ed interazione con le strutture biologiche.

Gli effetti sulla salute respiratoria sembrano più strettamente associati alla concentrazione in numero piuttosto che alla concentrazione in massa dei PM. Questa osservazione fa ritenere che le particelle ultrafini, il 20-40% delle quali derivano dagli scarichi di motori diesel e a benzina, potrebbero avere un ruolo importante nell'induzione di molti effetti fisiopatologici (Lin L. 2010).

Gli effetti specifici dei DEPs sullo sviluppo delle malattie allergiche respiratorie sono stati oggetto di numerosi studi *in vivo* su modelli animali, su linee cellulari *in vitro* e mediante valutazione di test clinici sull'uomo.

Studi sperimentali hanno dimostrato che l'esposizione acuta ai DEPs causa irritazione a naso, occhi, episodi di emicrania, anomalie nella funzionalità polmonare, affaticamento e nausea, mentre l'esposizione cronica è associata a tosse, produzione di muco e ad una riduzione delle capacità respiratorie (McCreanor J. 2007).

E' stato osservato che, i DEPs-PAHs possono modificare la risposta immune in modelli animali e nell'uomo, sono in grado di modulare i processi infiammatori delle vie aeree che inducono l'esacerbazione delle risposte di tipo asmatico. I DEPs, esercitano un effetto immunologico adiuvante sulla sintesi di IgE in soggetti atopici, influenzando così la sensibilizzazione agli aeroallergeni anche a causa di un'induzione della produzione di citochine ed ossido nitrico, ed alla presenza di sostanze con noto effetto adiuvante, come endotossine e β -glucano (Diaz Sanchez D. 1997). Tali particelle, possono interagire con gli allergeni ed aumentare la risposta indotta dal contatto con l'antigene; i livelli di IgE allergene specifiche risultano fino a 50 volte maggiori in soggetti allergici stimolati con DEPs ed allergeni, piuttosto che in pazienti trattati col singolo allergene (D'Amato G. 2000). Trattamenti combinati con DEPs e l'allergene maggiore di ambrosia (Amb a 1) hanno dimostrato *in vivo* un notevole aumento nell'espressione di IgE umane nasali totali ed allergene specifiche, ed un'alterata produzione di citochine di tipo T-helper 2 (Diaz Sanchez D. 1997).

Anche se è evidente che i DEPs esercitano un ruolo predominante nell'induzione della risposta allergica infiammatoria, alcuni *trials*, hanno dimostrato che gli inquinanti ambientali possono anche ridurre la concentrazione soglia degli allergeni aerodispersi, limitando quindi, gli episodi allergici in soggetti sensibilizzati (D'Amato G. 2000, 2005).

Dal momento che, gli allergeni o il materiale particolato aerodisperso sono presenti in atmosfera a concentrazioni estremamente variabili, non risulta facile valutare e quantificare l'impatto dell'inquinamento ambientale sulla salute, nè tantomeno, stabilire una relazione diretta tra esposizione e tempo di esacerbazione delle patologie respiratorie.

Una migliore comprensione della relazione tra *background* genetico ed effetti biologici indotti dalle diverse fonti di inquinamento ambientale, potrebbe migliorare gli interventi terapeutici sulle condizioni asmatiche individuali, contenere l'insorgenza dell'infiammazione bronchiale in risposta a stimoli ambientali ed evitare lo sviluppo di modificazioni irreversibili delle funzioni respiratorie.

DEPs ed effetti biologici

Il ruolo biologico dei DEPs e gli effetti molecolari indotti da tali particelle sono stati oggetto di numerosi studi sia *in vivo* che *in vitro*. L'evidenza principale emersa, è l'effetto adiuvante dei DEPs nell'induzione e nello sviluppo della risposta allergica infiammatoria.

Gli studi *in vivo* su modelli murini di asma hanno dimostrato che, l'esposizione ai DEPs aumenta i livelli sierici di IgE totali specifiche così come la produzione di IL4, IL5 e GM-CSF (Takano H. 1997), incrementa il numero di eosinofili presenti nelle vie aeree, determinando iperplasia delle cellule caliciformi mucipare (*goblet cells*), ed iperresponsività bronchiale (Ichinose T. 2002). Ulteriori esperimenti sui ratti hanno dimostrato che, la sensibilizzazione con pollini e DEPs, per via intranasale o intratracheale, induce reazioni infiammatorie polmonari con infiltrazione di macrofagi ed eosinofili (Steerenberg PA. 1999).

Parallelamente agli esperimenti *in vivo*, anche numerosi studi *in vitro*, hanno analizzato gli effetti proinfiammatori dei DEPs su diversi *target* cellulari, confermando il ruolo biologico di tali particelle su più citotipi: cellule epiteliali ed endoteliali, eosinofili, mastociti, basofili, cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs), cellule B e cellule della linea monocito-macrofagica.

Le cellule epiteliali ed i macrofagi rappresentano il primo target delle particelle introdotte per via inalatoria e costituiscono una barriera metabolicamente attiva, deputata ai meccanismi di rimozione e di difesa. I macrofagi alveolari fagocitano i DEPs, si attivano, e rilasciano numerosi mediatori della risposta immunitaria infiammatoria e fattori pro-coagulanti.

Le cellule epiteliali polmonari sono attivamente coinvolte nella risposta alle sostanze tossiche inalate, il contatto con i DEPs induce la produzione di citochine proinfiammatorie e chemochine come IL1, IL6, IL8, TNF- α e GM-CSF (Riedl M. Diaz Sanchez D. 2005), di molecole di adesione endoteliale come ICAM-1 e VCAM-1 (Salvi S. 1999), e di molecole della matrice extracellulare, tra cui la fibronectina.

Ulteriori studi *in vitro*, hanno confermato che colture di cellule epiteliali bronchiali (BECs) di pazienti asmatici, rilasciano costitutivamente alti livelli di IL-8, GM-CSF, RANTES ed ICAM1 rispetto ai livelli osservati in soggetti non asmatici. L'esposizione di tali cellule a basse dosi di DEPs (10 μ g/ml), aumenta significativamente il rilascio di citochine infiammatorie in soggetti asmatici; diversamente, BECs di soggetti non asmatici richiedono concentrazioni più elevate di DEPs (50-100 μ g/ml) per indurre un aumento significativo di IL8 e GM-CSF (Bayram H. 1998).

L'interleuchina-8 è una citochina proinfiammatoria la cui concentrazione aumenta nei lavaggi broncoalveolari e nasali di pazienti asmatici e/o rinitici ed attiva a cascata: 1) la chemiotassi di altri tipi cellulari coinvolti nella risposta allergica, come linfociti, neutrofili ed eosinofili; 2) causa il rilascio di istamina; 3) determina la fuoriuscita di plasma; 4) induce la contrazione della muscolatura liscia delle vie aeree con conseguente aumento dell'iperreattività bronchiale. In questo contesto è interessante osservare che i DEPs inducono la degranolazione degli eosinofili umani e ne aumentano l'adesione alle cellule epiteliali nasali (Riedl M., Diaz Sanchez D. 2005).

Ulteriori conferme dell'azione dei DEPs sull'induzione della risposta allergica-inflammatoria sono state ottenute anche su altri tipi cellulari, tra cui le cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs). Nei PBMCs di soggetti allergici co-coltivati in presenza di DEPs ed allergeni è stato infatti rilevato un aumento sinergico di IL-8, RANTES, e TNF- α (Fahy O. 2000).

E' stato inoltre documentato che DEPs e PM possono esercitare la loro azione sulle vie aeree attraverso l'induzione di meccanismi di stress ossidativo (Ito T. 2006).

Nella patologia asmatica infatti, parallelamente al processo infiammatorio, si verifica un rimodellamento delle vie respiratorie; pertanto, lo stress ossidativo e il conseguente danno epiteliale indotto dai DEPs, potrebbero attivare o riattivare meccanismi morfogenetici responsabili dei cambiamenti strutturali nelle vie aeree, paragonabili ai complessi rimodellamenti che si verificano durante il processo di formazione delle ossa (Parnia S. 2002).

Ancora, un altro meccanismo di azione dei DEPs, forse il più importante, è l'aumento della penetrazione di allergeni o di materiale particolato attraverso la mucosa respiratoria.

L'inalazione dei DEPs danneggia l'epitelio bronchiale e le ciglia, attenua la frequenza del battito ciliare in cellule epiteliali bronchiali umane, impedendo la funzione protettiva della barriera biologica alle sostanze inalate (Mall MA. 2008). Gli allergeni quindi permangono sulla superficie epiteliale per più tempo, determinando cambiamenti morfologici e funzionali nelle cellule, permettendo una maggiore diffusione attraverso il monostrato epiteliale ed aumentando il tempo di contatto di tali sostanze con le cellule del sistema immunitario. (Parnia S. 2002). In figura 10 è riportata un'analisi effettuata al microscopio elettronico a scansione, dopo trattamento della linea cellulare di epitelio bronchiale umana A549, con due diverse concentrazioni di particolato fine. Dopo 24 ore di trattamento risulta ben visibile l'interazione e l'adesione stabile del materiale particellare alla superficie cellulare; per tempi prolungati (48 e 72 ore) si osservano anche, severe alterazioni della morfologia cellulare, il distacco di alcune cellule dal substrato e un parziale *blebbing* di membrana, riarrangiamenti

nei microvilli probabilmente causati dall'aggregazione delle particelle fini in *clusters* sparsi sulla superficie cellulare (Calcabrini A. 2004).

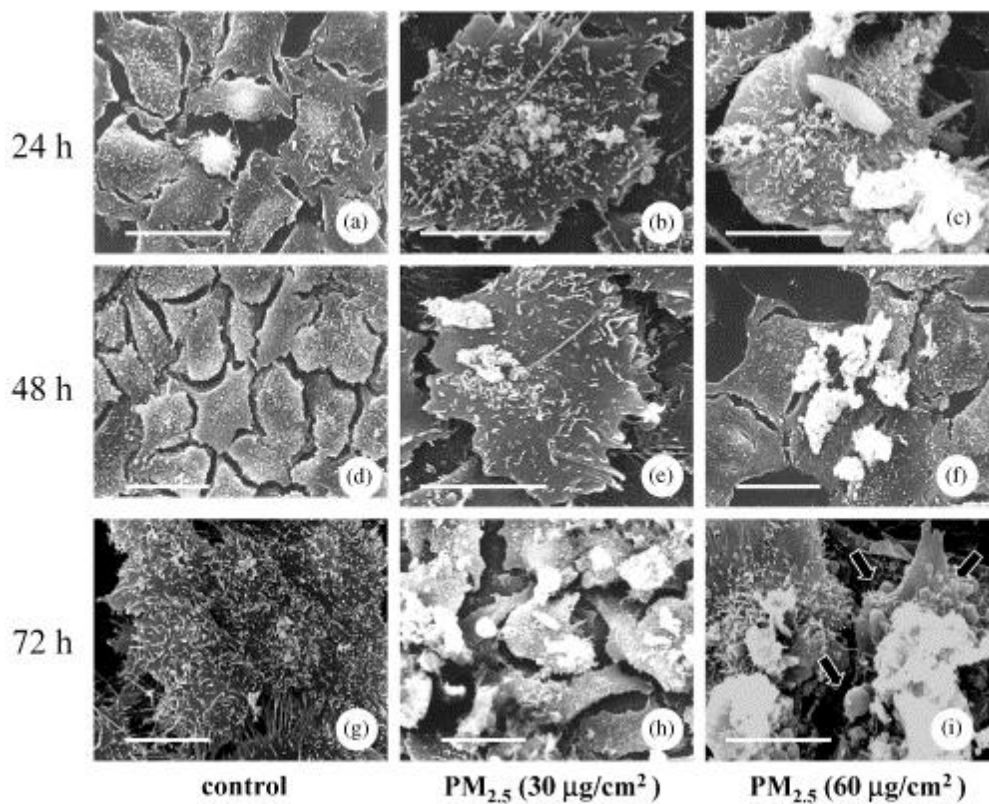


Figura 10. Analisi di microscopia elettronica a scansione in cellule A549.

Nell'ambito dello stesso studio, gli autori hanno dimostrato l'internalizzazione del PM da parte delle A549 e visualizzato, mediante tecniche di microscopia elettronica a trasmissione, l'inclusione delle particelle in strutture citoplasmatiche. In alcune cellule, il particolato amorfo è stato ritrovato in prossimità delle fibre citoscheletriche, suggerendo un coinvolgimento delle componenti microfilamentose del citoscheletro nell'internalizzazione e nei successivi movimenti del PM all'interno della cellula (Calcabrini A. 2004).

L'esposizione ai DEPs rileva pertanto un danno di membrana dose e tempo dipendente. Indagini di citofluorimetria hanno confermato questo meccanismo di fagocitosi rilevandone la non-specificità, dal momento che, sono stati osservati meccanismi simili sia dopo trattamenti con DEPs e *carbon black* (prodotto dalla combustione incompleta di prodotti petroliferi pesanti), sia in seguito a stimolazione con particelle di lattice (Boland S. 1999).

Gli effetti biologici dei DEPs sull'adesione cellulare, sulla motilità e sulle alterazioni strutturali del citoscheletro sono stati analizzati soltanto in pochi studi sperimentali.

Le cellule epiteliali bronchiali instaurano giunzioni strette intercellulari ed aderiscono alla membrana basale sottostante, modulando attraverso queste interazioni, la morfologia, la

proliferazione, ed i caratteri differenziativi. Nell'asma, il danno all'epitelio bronchiale è spesso associato all'alterazione dell'integrità della membrana basale e dei contatti cellula-cellula (der Boer WI. 2008). Il gruppo di Doornaert e collaboratori ha valutato la modulazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice in linee di epitelio bronchiale (HBE), in risposta all'esposizione ai DEPs; tale indagine è stata svolta misurando l'espressione di specifiche molecole di adesione responsabili di interazioni omotipiche ed eterotipiche (E-caderina, CD44, integrine) ed analizzando le componenti citoscheletriche (filamenti di actina, adesioni focali) coinvolte nei cambiamenti della morfologia cellulare, dell'organizzazione del citoscheletro e della migrazione cellulare. I risultati hanno dimostrato che i DEPs alterano, sia le interazioni tra HBE e matrice cellulare, che le connessioni cellula-cellula, inducendo un rimodellamento della ECM associato ad una diminuzione delle capacità adesive e ad una ridotta capacità di riparazione cellulare in risposta ai danni meccanici (Doornaert B. 2003).

In questi meccanismi di interazione con l'ECM, sembrano prevalentemente coinvolte le metalloproteinasi di matrice. Lo squilibrio tra MMP1 ed inibitori (TIMP1 e 2) a favore degli inibitori, determina variazioni nella composizione della matrice extracellulare e l'alterazione dei contatti tra le cellule e l'ECM. Le cellule perdono la capacità di interagire con la matrice extracellulare, accentuando la suscettibilità allo *shedding* (Doornaert B. 2003).

Tutti i dati riportati suggeriscono che, i DEPs oltre ad innescare su più *target* cellulari, reazioni di tipo infiammatorio, sono in grado di alterare le interazioni cellula-matrice e la coesione cellulare, determinando un decremento nell'espressione di molecole di adesione e una riduzione della *stiffness* citoscheletrica.

Gli studi *in vitro* sugli effetti dei DEPs, spesso mostrano discrepanze e non sono sempre concordi sui risultati ottenuti. A tale proposito va sottolineato che, la composizione delle particelle e degli estratti di particolato atmosferico, è estremamente variabile in relazione alle condizioni delle procedure di estrazione ed ai macchinari utilizzati. Miscele diverse pertanto, testate su sistemi cellulari eterogenei non avranno degli effetti sempre perfettamente ripetibili (Riedl M., Diaz Sanchez D. 2005).

MATERIALI E METODI

Campionamento

La prima fase dello studio si è incentrata sul reclutamento di un campione rappresentativo di 1101 studenti, compresi in una fascia di età variabile tra gli 11 e i 14 anni, alunni di 16 scuole medie inferiori della città di Palermo (Leonardo da Vinci, Vittorio Emanuele Orlando, Borghese, Marconi, Verdi, Cesareo, Boccone, Bonfiglio, Russo, Buonarroti, Vittorio Emanuele III, Gramsci, Franchetti, Quasimodo, Roncalli, Sferracavallo) distribuite su tutto il territorio, come mostrato in figura 11.



Figura 11. Localizzazione geografica nella città di Palermo delle Scuole Medie Statali che hanno aderito al progetto.

La raccolta di dati anamnestici e campioni biologici su tali soggetti è avvenuta in tre fasi distinte e relative ai bimestri aprile-maggio 2007 (415 studenti), novembre-dicembre 2007 (281 studenti) ed aprile-maggio 2008 (405 studenti). Ciascuno studente preso in esame è stato oggetto di *screening* mediante previa somministrazione di un questionario di 129 domande sulla salute respiratoria e sugli stili di vita familiari. Successivamente ogni alunno è stato sottoposto ad analisi di tipo clinico tra cui: prove allergiche SPT "Skin Prick Test" per valutare la reattività antigenica di ciascun soggetto ai seguenti 9 allergeni: dermatophagoides, parietaria, olivo, gatto, alternaria, graminacee, blatta, cane; analisi del picco di flusso

espiratorio (PEF) e valutazione della capacità ventilatoria polmonare mediante spirometria (volume espiratorio forzato FEV).

Dopo acquisizione del consenso informato per il test genetico da parte dei genitori, su ciascun ragazzo è stato effettuato un prelievo di un campione di saliva e un prelievo di cellule derivate dall'epitelio buccale, raccolte con un tampone di cotone, definito tampone orale o *oral swab*.

Tutte le indagini di *screening* preliminare e di reclutamento del gruppo di studenti necessari allo studio, sono state effettuate in collaborazione e svolte parallelamente ad una *equipe* di pneumologi, allergologi e psicologi dell'IBIM-CNR di Palermo.

Estrazione del DNA genomico

Il prelievo salivare è stato immediatamente trattato per l'isolamento delle cellule.

Al prelievo è stato aggiunto un egual volume di PBS e quindi centrifugato a 3000g per 10 minuti, in modo da sedimentare le cellule senza lisarle. Il lavaggio è stato ripetuto 2 volte, quindi un'aliquota di cellule sono state prelevate per l'estrazione del DNA genomico e la restante parte è stata immediatamente congelata alla temperatura di -80°C.

Il pellet così ottenuto è stato sottoposto ad una fase di pre-trattamento per 10 minuti a 58°C con Proteinasi K (Applied Biosystem (ABI), Foster City, CA).

Alla sospensione ottenuta sono stati aggiunti 8 volumi di BloodPrep DNA Purification Solution (ABI, Foster City, CA) preriscaldata a 37°C e successivamente il campione è stato risospeso vigorosamente al vortex per 30 secondi.

La sospensione è stata sottoposta all'estrazione del DNA genomico, mediante utilizzo di un estrattore semi-automatico DNA, RNA ABI PRISM 6100 (ABI, Foster City, CA).

Tale procedura permette l'inserimento nello strumento di una piastra da 96 pozzetti Genomic DNA Purification Tray II (ABI, Foster City, CA) e l'estrazione simultanea di 96 campioni di DNA genomico.

Ciascun campione, dopo esser stato opportunamente pre-trattato è stato stratificato sulla piastra *Genomic DNA Purification Tray II*, ed è stato avviato nello strumento un protocollo standard che prevede:

- l'applicazione di vuoto ad una potenza dell'80% per 300 secondi per agevolare la stratificazione del campione;
- l'aggiunta di 650 µl di *BloodPrep DNA Purification Solution* preriscaldata e nuovamente un vuoto ad una potenza dell'80% per 300 secondi;

- l'aggiunta rispettivamente di 650 µl, 600 µl e 300 µl di *BloodPrep DNA Wash Solution* in tre fasi differenti tutte sottoposte ad un vuoto dell'80% per 60 secondi.

- l'aggiunta finale di 100 µl di *Elution Solution I* (lasciati incubare per 3 minuti) e di 100 µl di *Elution Solution II* e un vuoto ad una potenza del 60% per 120 secondi.

Il volume di eluizione recuperato pari a 200 µl, è stato conservato a -20°C per le successive analisi di *genotyping*.

La qualità e quantità del DNA genomico ottenuto sono state valutate mediante lettura spettrofotometrica (rapporto OD²⁶⁰ e OD²⁸⁰) ed elettroforesi su gel d'agarosio (1% in TBE).

Genotipizzazione

L'analisi di *genotyping* è stata effettuata con un sistema *Step-One Real-Time PCR* (Applied Biosystem (ABI), Foster City, CA) utilizzando i seguenti *Taqman SNP Genotyping Assays*: ID C__9272423_10 per il polimorfismo **rs4795400** del gene GSDMB (ABI, Foster City, CA), ID C_29062108_10, per il secondo SNP **rs7216389** sempre localizzato nel gene GSDMB (ABI, Foster City, CA) e ID C__1385764_10 per il polimorfismo **rs8076131** di ORMDL3. Questi saggi sono costituiti da una miscela di *primers forward* e *reverse* non marcati, specifici per il sito di interesse, e da due sonde *TaqMan-MGB* specifiche per ogni allele, marcate al 5' con i fluorocromi FAMTM e VIC®, disegnate per consentire la discriminazione allelica di specifici polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs). Per ciascuna reazione sono stati utilizzati 10µl di *TaqMan® Genotyping Master Mix (2X)* (ABI, Foster City, CA), 1µl di *SNP Genotyping Assay (20X)* e 10ng di DNA genomico.

La *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (ABI, Foster City, CA) contiene il buffer di reazione, i dNTPs e la Taq Gold Polimerasi.

Le condizioni di amplificazione e genotipizzazione di ciascuna reazione sono state le seguenti: 60°C per 30 secondi, 95°C per 10 minuti e 40 cicli di: denaturazione a 95°C per 15 secondi, appaiamento ed estensione a 60°C per 1 minuto.

La discriminazione genotipica è possibile perché ogni *Taqman Assays* contiene due sonde marcate con *reporter* fluorescenti e *quenchers*. La sonda contenente l'allele1 è coniugata al reporter VIC (fluorescenza nel verde), e la sonda contenente l'allele2 è coniugata al reporter 6-FAM (fluorescenza nel rosso); quando i fluorofori ed i *quenchers* sono fisicamente vicini, non si ha emissione di fluorescenza.

Al contrario se il fluoroforo è separato dalla sonda e dal *quencher*, emette fluorescenza alla lunghezza d'onda specifica, strettamente dipendente dalla composizione chimica del relativo fluoroforo, come mostrato in figura 12.

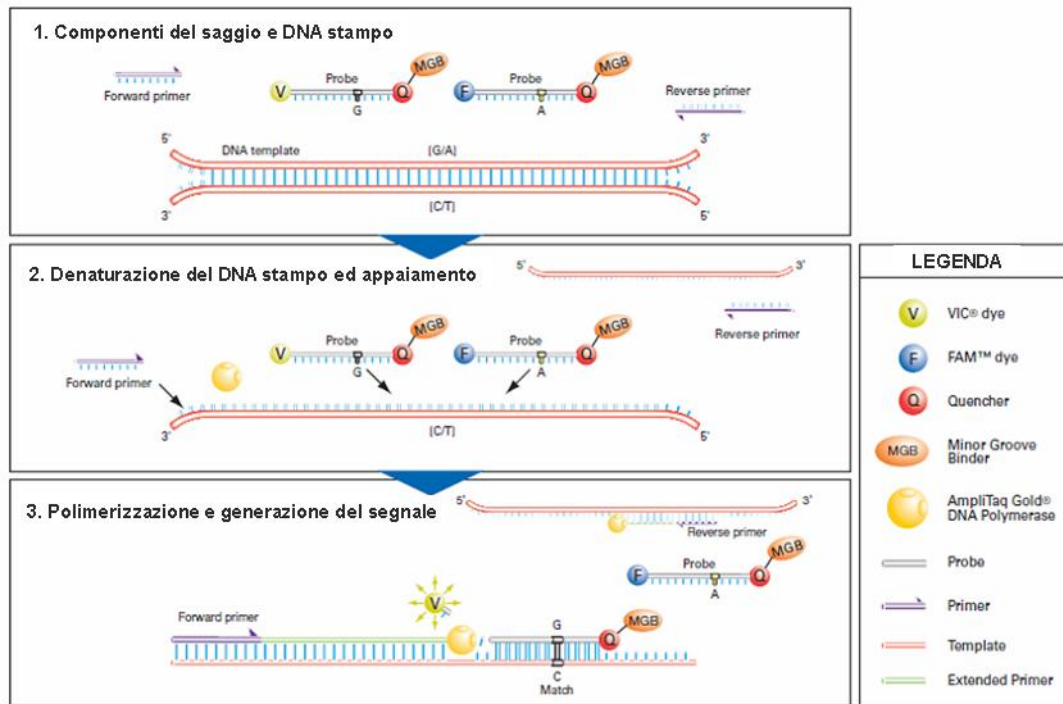


Figura 12. Meccanismo d'azione della tecnologia TaqMan®.

Tale emissione è quindi captata da un sensore presente nell'apparecchio ed il software v.2.0 (ABI, Foster City, CA) discrimina le differenti fluorescenze emesse e le associa ai rispettivi alleli. Il risultato di tale analisi è poi visualizzato in un "plot di discriminazione allelica", un grafico che permette l'attribuzione certa del genotipo per ciascun campione di DNA genomico preso in esame.

L'analisi dell'SNP dell'enzima GSTP1 è stata effettuata in collaborazione con la sezione di ematologia dell'Azienda Ospedaliera Cervello. Il polimorfismo A313G (rs1695), nell'esone 5 del gene GSTP1, è stato analizzato con la tecnica del minisequenziamento o SnapShoot Multiplex System (ABI, Foster City, CA), una procedura di estensione dei *primers* che consiste in una reazione di PCR effettuata in presenza di un template purificato con ExoSap-it, *primers* oligonucleotidi non marcati (*primers SNPs*), DNA polimerasi e dideozinucleotidi (*ddNTPs*), marcati con fluorocromi e sprovvisti del gruppo -OH in posizione 3'. Segue la purificazione enzimatica dei prodotti di estensione con ExoSAP-it (USB Corporation) e la separazione elettroforetica capillare con sequenziatore ABI PRISM 3130.

Analisi statistiche

Per valutare le associazioni esistenti tra i dati ottenuti dalle analisi di genotipizzazione e i dati fenotipi e clinici raccolti è stata eseguita un'analisi statistica utilizzando il programma Stat-View 5.0.1 (1992-98, SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, NC, USA).

L'analisi della varianza e il test del chi quadro (χ^2) sono stati utilizzati per valutare le differenze tra gruppi. La relazione tra i vari fattori di rischio e la presenza di rinite allergica è stata studiata mediante regressione logistica multinomiale.

Per ciascuna allergia, è stata specificata una variabile categoriale con due sole modalità: assente (=0) e presente (=1). Le informazioni relative ai fenotipi associati alle diverse allergie sono state sintetizzate in un'unica variabile qualitativa, avente tre diverse modalità (controllo=0; asma=1; rinite=2).

I polimorfismi di GSDMB e di ORMDL3 sono stati rappresentati sia secondo un modello recessivo tramite una variabile categoriale con due sole modalità ad esempio T/C, che secondo un modello codominante analizzando separatamente i tre genotipi con modalità TT, TC, CC.

Tutti i test sono stati considerati statisticamente significativi per un p -value ≤ 0.05 . Per misurare la forza dell'associazione tra le variabili considerate sono stati inoltre calcolati l'Odds Ratio (OR) e i rispettivi intervalli di confidenza (IC) al 95%.

Colture cellulari

La linea cellulare A549 è una linea derivata da adenocarcinoma polmonare non a piccole cellule. Questa linea cellulare presenta caratteristiche fenotipiche molto vicine a quelle delle cellule alveolari di tipo II e mostra proprietà tipiche delle cellule epiteliali alveolari primarie, come l'espressione di citocheratine e parametri simili di crescita.

Le A549 sono state coltivate nelle seguenti condizioni: terreno RPMI-1640 (Euroclone, U.K.) arricchito con 10% di siero bovino fetale (FBS) (Euroclone, U.K.), 100U/mL di penicillina, 100µg/mL di streptomina (Euroclone, U.K.) e glutammina 2mM (Euroclone U.K.). Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂.

Esposizione ai DEPs e all'estratto proteico di *Parietaria judaica*

Per le analisi *in vitro* e per i saggi funzionali le A549 sono state seminate, lasciate aderire e fatte crescere fino al raggiungimento del 90% di confluenza. Il materiale particolato utilizzato per gli esperimenti è l'SRM1975 (NIST, Gaithersburg, MD. USA), una preparazione standard, commercialmente disponibile e costituita da una miscela di PAHs e nitro-PAHs, raccolta da un impianto industriale alimentato a diesel.

Tale miscela è stata aggiunta per 24 ore al terreno di coltura (RPMI-1640 in 2% FBS) ad una concentrazione pari a 20µg/ml. Il controllo sperimentale del trattamento con SRM1975 è costituito da cellule trattate con diclorometano (CDM), che è il solvente in cui è solubilizzata la miscela di idrocarburi utilizzata. Dopo la rimozione del terreno di coltura ed opportuni lavaggi in PBS completo, le A549 sono state trattate con l'estratto di proteine del polline di *Parietaria judaica* (in RPMI-1640 in assenza di FBS) alle concentrazioni di 250 e 500 µg/ml per 6, 12 e 24 ore.

Come già descritto in Taverna et al, brevemente l'estrazione delle proteine del polline di *Parietaria* è stata effettuata risospendendo il polline (Allergon AB, Ängelholm, Sweden) in Etere Dietilico a 4°C per 2 ore. Successivamente è stato centrifugato a 8000 rpm per 30 minuti e il *pellet* ben asciutto è stato risospeso in PBS e lasciato a 4°C *over night*. Dopo centrifugazione a 8000 rpm, per 30 minuti a 4°C, il supernatante è stato recuperato e dializzato contro acqua milliQ. Successivamente l'estratto è stato liofilizzato e conservato a -80°C (Taverna S. 2008).

Prima di aggiungere l'estratto alle cellule, la soluzione è stata resa sterile tramite filtraggio utilizzando filtri (Millipore) con pori da 0,22 µm.

Proliferaazione cellulare

Le A549 sono state staccate con tripsina/EDTA, risospese in terreno completo e contate al microscopio ottico con la camera di *Burker*.

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di 3.200 cellule/100 µl ed incubate a 37°C. Dopo 4 ore, il terreno di coltura è stato rimosso e sostituito con terreno fresco, a cui sono state aggiunte concentrazioni crescenti di SRM1975 (1, 10, 20 e 40 µg/ml) in RPMI-1640 in 2% FBS, o di estratto di proteine del polline di *Parietaria judaica* (50, 100, 150 e 500 µg/ml) in RPMI-1640 in assenza di FBS. Ad intervalli di tempo stabiliti (24, 48, 72, e 96 ore) per il trattamento con SRM1975 e 24, 48 ore per il trattamento con estratto di Pj, le cellule sono state private del loro terreno, lavate con PBS completo, fissate e colorate con cristal violetto. Dopo ripetuti lavaggi in H₂O corrente ai pozzetti è stata aggiunta la soluzione eluente (200µl) ed è stata effettuata una lettura allo spettrofotometro (ELISA *Reader*) alla lunghezza d'onda di 540 nm allo scopo di correlare l'assorbanza del colorante al numero di cellule presenti nel pozzetto.

Estrazione di RNA e retrotrascrizione

Dopo l'esposizione per 24 ore con 20µg/ml di SRM1975 (RPMI-1640 in 2% FBS) e per le successive 6, 12 e 24 ore con estratto di proteine del polline di *Pj* (in RPMI-1640 in assenza di FBS) alle concentrazioni di 250 e 500 µg/ml, le A549 vengono staccate con tripsina-EDTA, risospese in PBS e raccolte centrifugando a 1100 rpm per 5 minuti. L'estrazione dell'mRNA è effettuata con il kit Illustra RNA spin (GE Healthcare, San Francisco, CA, USA) seguendo il protocollo della casa produttrice.

La reazione di retrotrascrizione è preliminare ad una valutazione quantitativa dell'espressione genica mediante real-time PCR. Per garantire l'esattezza dei dati quantitativi, è opportuno che venga retrotrascritta una uguale quantità di RNA per ogni campione (2µg).

L'RNA totale è stato retrotrascritto mediante il kit "*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*" (ABI, Foster City, CA) contenente tutti i componenti necessari per la conversione quantitativa di 2µg di RNA totale in cDNA, in un volume di reazione pari a 20µl. Ai 2µg di RNA totale sono stati aggiunti Random Primers, RT Buffer, dNTP's e trascrittasi

inversa MultiScribe™ forniti dal kit, secondo le indicazioni della casa produttrice. La miscela di reazione è stata incubata 10 minuti a 25°C e successivamente 2 ore a 37°C.

Real Time PCR

Tutti gli esperimenti di *Real Time PCR* sono stati eseguiti con un sistema *Step-One Real-Time PCR* (Applied Biosystem (ABI), Foster City, CA) con i seguenti parametri di amplificazione: *holding stage* 95°C 20 secondi, *cycling stage* (per 40 cicli) 95° 1 secondo e 60° 20 secondi.

La quantità di cDNA utilizzata per ciascuna reazione è pari a 2µl del prodotto ottenuto dalla retrotrascrizione di 2µg di RNA totale.

Al fine di una valutazione quantitativa dell'espressione del gene di interesse sono stati utilizzati i seguenti TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystem): Hs00277001_m1 per il gene ICAM1 e Hs00174103_m1 per il gene IL8. La miscela di reazione è costituita da 10µl di TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x), No AmpErase® UNG fornita dalla casa produttrice, contenente il buffer di reazione, i dNTPs e la Taq Gold Polimerasi, a cui è aggiunto 1µl di TaqMan® Gene Expression Assay, in un volume finale di 20µl. Il TaqMan® Gene Expression Assay contiene i due oligonucleotidi templatato specifici (utilizzati alla concentrazione finale di 900nM) e la sonda FAM Dye-Labeled TaqMan MGB (250 nM finale). Contestualmente viene amplificato un controllo endogeno costitutivamente espresso, GAPDH (Human GAPD, 4352934E, ABI, Foster City, CA) marcato con FAM/MGB per la normalizzazione dei dati di espressione genica.

Analisi del citoscheletro ed immunofluorescenza

Le A549 sono state seminate alla concentrazione di 100.000 cellule/pozzetto su vetrini collagenati (Calf skin, Calbiochem) (1µg di collagene per cm² in acido acetico 0.5M) posti in piastre da 24 wells, e lasciate aderire over night. Le stesse cellule sono state poi incubate per 24 ore con 20µg/ml di SRM1975 (RPMI-1640 in 2% FBS) e successivamente per altre 24 ore con 250 e 500 µg/ml di estratto di proteine del polline di *Pj* (in RPMI-1640 in assenza di FBS).

Al termine dell'incubazione le cellule sono state fissate in paraformaldeide (3,7% in PBS) per 10 minuti e i vetrini sono stati sottoposti a 3 lavaggi in PBS per 5 minuti.

Allo scopo di permeabilizzare la membrana delle cellule e consentire l'ingresso della falloidina rodaminata o degli anticorpi primari utilizzati per la marcatura, i vetrini sono stati esposti per 2,30 minuti all'azione del Triton X-100 (PBS/TX-100 0,1%), un detergente che crea dei pori nella membrana plasmatica.

Le cellule, sono state quindi incubate con una soluzione saturante contenente PBS/BSA 1% per 1 ora; per quanto riguarda l'analisi del citoscheletro, i vetrini sono stati prelevati dai pozzetti e trattati per 30 minuti, con una soluzione di falloidina rodaminata. La falloidina è una molecola fotosensibile estratta dal fungo velenoso *Amanita phalloides*, che lega specificatamente i filamenti di actina già polimerizzati. La rodamina è un fluorocromo che ci permette di visualizzare i filamenti di actina perché il suo spettro di emissione ricade nella lunghezza d'onda del rosso.

Per quanto riguarda gli esperimenti di immunofluorescenza, dopo l'aggiunta della soluzione saturante per un ora, i vetrini sono stati incubati in PBS/BSA 1%, con i rispettivi anticorpi primari: E-caderina (Rabbit polyclonal diluito 1:100, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), β -catenina (Mouse mAb diluito 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) e lasciati overnight a 4°C. Il giorno seguente, dopo opportuni lavaggi in PBS, sono stati aggiunti i corrispondenti anticorpi secondari (Texas Red® goat α -rabbit IgG diluito 1:250, Invitrogen e Fluorescein goat α -mouse diluito 1:100, Molecular Probes, Invitrogen) in una soluzione di PBS/BSA 1% ed incubati per un ora a 37°C.

Dopo ripetuti lavaggi in PBS e in H₂O i vetrini sono stati posti su un vetrino portaoggetti con 3 μ l di *mounting solution*.

La rilevazione del segnale di fluorescenza e l'acquisizione delle immagini (ingrandimento 60X ad immersione) è avvenuta tramite osservazione al microscopio confocale (Olympus 1X70 con sistema laser Melles Griot).

Saggi di motilità: Camera di Boyden e Wound-healing assay

Le A549 sono state seminate alla concentrazione di 300.000 cellule/pozzetto in piastre da 6 wells, lasciate aderire, e trattate per 24 ore con 20 μ g/ml di SRM1975 (RPMI-1640 in 2% FBS) e successivamente per altre 24 ore con 250 e 500 μ g/ml di estratto di proteine del polline di *Pj* (in RPMI-1640 in assenza di FBS). Dopo le due diverse fasi di trattamento, le cellule sono state raccolte e le loro capacità migratorie sono state testate mediante la camera di Boyden.

Il principio si basa sulla capacità del chemoattrattante, posto nella camera inferiore, di stimolare il passaggio delle cellule, dai pozzetti superiori a quelli inferiori, attraverso un filtro di policarbonato con pori dal diametro di 8µm. Per il saggio della motilità la membrana di policarbonato è stata pre-trattata *over night* con una soluzione di collagene 1µg per cm² in acido acetico 0.5M e lasciata asciugare a temperatura ambiente.

Le cellule A549 sono state incubate per 24 ore con 20µg/ml di SRM1975, successivamente trattate con estratto proteico di *Pj* per altre 24 ore, infine staccate con tripsina/EDTA e lasciate in terreno completo per circa 60 minuti. Dopo centrifugazione le cellule sono state risospese alla concentrazione di 1x10⁶/ml in terreno RPMI-1640 con BSA allo 0.1%.

Nei pozzetti inferiori della camera di Boyden sono stati dispensati 28 µl di chemoattrattante per pozzetto (RPMI-1640 con FBS al 10%), la camera è stata assemblata adagiando il filtro di policarbonato nell'interfaccia tra i pozzetti inferiori e superiori, e sigillando con delle viti i due blocchi (inferiore e superiore). Nei pozzetti superiori della camera sono stati trasferiti 56µl della sospensione cellulare di 1x10⁶ cellule/ml in terreno RPMI-BSA 0.1% ed la camera di Boyden è stata incubata overnight, in camera umida a 37°C e 5% di CO₂.

Le cellule rimaste sulla porzione superiore del filtro sono state rimosse, quelle migrate sono state fissate e colorate con il Diff-Quick, che colora nucleo e citoplasma della cellula; l'eccesso di colorante è stato rimosso da due passaggi in dH₂O al termine dei quali la membrana viene fatta aderire al vetrino. Le cellule migrate sono state, infine, contate al microscopio analizzando cinque campi per condizione.

I risultati riportati sono la media di due esperimenti indipendenti, ciascuno dei quali è stato eseguito in sestuplicato.

I saggi di riparazione della ferita (*Wound-healing assay*) sono stati eseguiti facendo crescere fino alla confluenza in pozzetti di una piastra da 6, le A549 pre-trattate per 24 ore con SRM1975 (RPMI-1640 in 2% FBS); sul monostrato così ottenuto è stata realizzata una "ferita" o "taglio" staccando una striscia di cellule mediante un puntale sterile. Dopo aver rimosso le cellule staccate mediante dei lavaggi in PBS, è stato aggiunto RPMI-1640 (in assenza di FBS), contenente 100, 250 e 500 µg/ml di estratto di proteine del polline di *Pj* per altre 24 ore; la piastra è stata incubata a 37°C con CO₂ al 5% e monitorata per 48 ore.

A 24 e a 48 ore le cellule sono state osservate al microscopio per quantificare la capacità di riparare la ferita. Per ciascuna condizione le cellule sono state fotografate a tempo 0 (al momento in cui è stato effettuato il taglio) ed a 24 e 48 ore. La richiusura della ferita è stata misurata col programma Image J, paragonando la larghezza dello scratch effettuato a t=0 con

quello dopo trattamento per $t=24$ o $t=48$ ore e valutando le differenze significative tra controllo e trattato.

Estrazione e quantizzazione delle proteine totali

Le A549 sono state seminate alla concentrazione di 5×10^6 cellule/fiasca T75, lasciate aderire overnight ed incubate per 24 ore con 20 μ g/ml SRM1975 (RPMI-1640 in 2% FBS). Dopo la rimozione del terreno di coltura ed opportuni lavaggi in PBS completo, le A549 sono state trattate con l'estratto di proteine del polline di *Parietaria judaica* (in RPMI-1640 in assenza di FBS) alle concentrazioni di 250 e 500 μ g/ml 24 ore.

Al termine dell'incubazione, il terreno di coltura è stato rimosso, le cellule sono state sottoposte a tre lavaggi con PBS, raccolte con un *cell scraper* e centrifugate a 1100 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente. Il *pellet* ottenuto è stato risospeso in un opportuno volume di tampone di lisi (300mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7,6, TritonX-100 0,5%, 1mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptina, 10 μ g/ml aprotinina 0,4mM Na-ortovanadato, 0,4mM EDTA, 10mM Na-pirofosfato, 10mM Na-fluoride) ed incubato per un'ora e mezza in ghiaccio. Successivamente, il lisato è stato centrifugato a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C al fine di rimuovere il DNA ed i detriti cellulari. Le proteine totali estratte, contenute nel supernatante, sono state poi quantizzate. A 350 μ l di *Coomassie protein assay reagent kit* (Pierce, Rockford, IL, USA) sono stati aggiunti 10 μ l di campione opportunamente diluito in H₂O. Il *Coomassie* è un colorante che lega stabilmente le proteine ogni due legami peptidici; la sua colorazione vira da marrone a blu, quando passa da uno stato non coniugato ad uno in cui è legato alle proteine. La lettura è stata effettuata mediante un lettore ELISA (*EL800 Bio-Tek Instruments*), ad una lunghezza d'onda di 595nm e i valori sono stati azzerati rispetto al bianco (350 μ l di *Coomassie* + 10 μ l di tampone di lisi opportunamente diluito). Il lettore di piastra misura l'assorbanza di ciascun campione (preparato in triplicato), tale valore viene poi convertito in concentrazione proteica dividendo la media delle tre letture per la pendenza di una curva standard di sieralbumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e infine moltiplicando per il fattore di diluizione. La curva di BSA viene costruita precedentemente a partire da una concentrazione nota e da successive diluizioni seriali dello stesso standard.

Analisi di Western Blot

Aliquote da 60-80µg di proteine totali sono state diluite in un volume opportuno di *sample buffer* contenente: 0,125M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 0,08M DTT, 0,1% bromofenolo blu, 20% glicerolo. Il campione così diluito è stato bollito per 5 minuti per ottenere la denaturazione delle proteine e separato mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 8% (Acilamide/Bisacrilamide (30:0,8), 1,5M Tris-HCl (pH 8,8), 10% SDS, 10% APS, TEMED, dH₂O) secondo la procedura descritta da Laemmli (1970). La corsa elettroforetica è stata effettuata a 150V per un'ora circa in presenza di un opportuno tampone di corsa (0,2M Tris base, 1,9M glicina ed SDS 0,1%). Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato rimosso dalla camera ed equilibrato per qualche minuto nel tampone di trasferimento (0,2M Tris base, 1,9M glicina, metanolo 20%). Il trasferimento delle proteine è stato eseguito a 50V per 1 ora utilizzando uno specifico sistema a "sandwich", in cui il gel è a diretto contatto con la membrana, tra due fogli di carta 3MM e due spugnette assorbenti; tale sistema consente il passaggio delle proteine dal gel ad una membrana di nitrocellulosa precedentemente attivata con dH₂O (Amersham, GE-healthcare, Buckinghamshire, U.K.).

Successivamente la membrana stessa è stata colorata con *rosso ponceau* (0,1% rosso ponceau in 5% acido acetico) per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine, decolorata con dH₂O, incubata per un ora a temperatura ambiente e in agitazione nella soluzione saturante (5% *milk non fat dry* in TBS-T).

Dopo 5 lavaggi da 5 minuti in TBS-T (20mM Tris-Base, 140mM NaCl a pH 7,6 e 0,1% tween-20), la membrana è stata incubata overnight in agitazione a 4°C, con i seguenti anticorpi primari: anti-E-caderina (Rabbit polyclonal diluito 1:250 in 5% milk TBS-T, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) anti-β-actina purificato nel nostro laboratorio (Chicken IgY diluito 1:8000 in 5% BSA TBS-T) (Alessandro R. 2009).

Dopo opportuni lavaggi in TBS-T, la membrana è stata incubata per un ora a temperatura ambiente gli opportuni anticorpi secondari coniugati alla perossidasi: Goat Anti-Rabbit IgG-HRP conjugate, diluito 1:10000 in 5% milk TBS-T, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e (Rabbit Anti-Chicken IgY-HRP coniugate, diluito 1:30000 in 5% milk TBS-T, Abcam, Cambridge Science Park, UK.).

L'avvenuta interazione tra anticorpo primario e secondario viene rivelata in presenza di una specifica soluzione contenente il substrato della perossidasi (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA). La reazione di

chemiluminescenza emette un segnale in grado di impressionare una lastra fotografica sviluppata successivamente con opportune soluzioni di sviluppo e fissaggio (Kodak).

Saggio di adesione dei PMN alle A549: isolamento dei polimorfonucleati (PMN) e colorazione con mieloperossidasi

Circa 10ml di prelievo venoso da volontario sano sono stati diluiti in PBS (1:1) e stratificati su gradiente di Ficoll (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). Dopo centrifugazione per 30 minuti a 2000rpm è stata prelevata la banda di PMN, depositata appena sopra il precipitato di globuli rossi. Il recupero di tale banda è difficoltoso ed inevitabilmente si preleva anche un certo numero di globuli rossi. Gli eritrociti contaminanti sono stati quindi eliminati mediante lisi ipotonica in un opportuno tampone (NaH_4Cl 1.5M, KHCO_3 100mM, Na_4EDTA 10mM, in dH_2O). Le cellule recuperate sono state sottoposte a successivi passaggi di purificazione ripetendo le tappe di lisi e ulteriori lavaggi in PBS. Il precipitato ottenuto, contenente i PMN estratti, è stato risospeso in RPMI-1640 e le cellule sono state contate in camera di Burker.

I polimorfonucleati sono stati piastrati (in piastre da 24 alla densità di 800.000 cellule/pozzetto), su un monostrato di A549 pre-trattate con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SRM1975 (RPMI-1640 in 2% FBS) per 24 ore, e con 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di estratto proteico di Pj (in RPMI-1640 in assenza di FBS) per ulteriori 24 ore. Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C e 5% di CO_2 per circa tre ore. Dopo l'adesione, le cellule sono state colorate con un kit per mieloprossidasi (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA), che consente la rivelazione dei polimorfonucleati. Il protocollo di colorazione è stato quindi adattato alle nostre condizioni sperimentali e le cellule sono state osservate al microscopio, fotografate e contate.

RISULTATI E DISCUSSIONE (I)

ANALISI DI POLIMORFISMI GENETICI E SUSCETTIBILITA' INDIVIDUALE NELLE ALLERGOPATIE RESPIRATORIE

Campionamento

Le attività di reclutamento, di raccolta dei dati clinici ed anamnestici e di campionamento, sono state svolte in collaborazione con il gruppo dell'IBIM-CNR di Palermo.

I dati ottenuti da questa prima fase, raccolti presso le 16 Scuole Medie Statali di Palermo elencate in Materiali e Metodi, hanno fornito la possibilità di organizzare un *database* con una casistica di 1100 soggetti.

Le caratteristiche generali del campione di riferimento, in relazione a diversi parametri tra cui sesso, età, altezza, peso, indice di massa corporea, atopia, esposizione al fumo passivo ed esposizione al traffico pesante, sono state analizzate dal gruppo dell'IBIM-CNR e non saranno dettagliatamente descritte nel presente lavoro.

Tra i fattori elencati, l'età ed il sesso, risultano particolarmente importanti negli studi di genetica di popolazione ed influenzano, insieme ad altri parametri clinici, lo sviluppo delle patologie allergiche respiratorie.

L'età adolescenziale ad esempio, è un fattore di rischio per l'insorgenza delle malattie asmatiche; il fenotipo asmatico nei bambini infatti, risulta differente in relazione all'età.

Un altro fattore che incide sullo sviluppo delle allergopatie respiratorie è il sesso. E' stato recentemente dimostrato che il sesso femminile è associato ad un maggior rischio di sviluppare la patologia asmatica, ad una maggiore persistenza dei sintomi e all'insorgenza precoce della malattia rispetto al sesso maschile (Bisgaard H., Bønnelykke K. 2010).

Relativamente ai parametri età e sesso, la popolazione generale oggetto di studio è risultata composta da 552 femmine e 548 maschi, con un età media di 12 anni, per entrambi i sessi.

Al fine di correlare i dati dell'analisi genetica con i fenotipi patologici di interesse, la popolazione è stata preliminarmente suddivisa in tre macrogruppi: asmatici (146 soggetti), rinitici (418 soggetti) e controlli (534 soggetti). Solo per 3 soggetti non è stato possibile attribuire un fenotipo.

Il sottogruppo di soggetti asmatici include tutti gli studenti che hanno risposto in modo affermativo alla domanda del questionario: "hai mai avuto asma?". La condizione asmatica

quindi, è definita in modo generico, sulla base di un episodio verificatosi almeno una volta nella vita del bambino (*asma ever*).

Nella categoria di soggetti rinitici invece, rientrano tutti gli studenti che hanno risposto affermativamente alla domanda “hai mai avuto starnuti ricorrenti, naso che cola o episodi di ostruzione nasale, diversi dal comune raffreddore?”. Questo gruppo di soggetti include gli studenti che hanno manifestato segni clinici di rinite almeno una volta nella vita (*rinite ever*). Al fine di utilizzare un criterio di classificazione più selettivo e attendibile, nelle analisi di associazione genica, sono stati considerati gli studenti che oltre ad avere risposto affermativamente alla domanda riportata per la *rinite ever*, hanno avuto manifestazione clinica di rinite nei 12 mesi antecedenti la compilazione del questionario (*rinite 12 mesi*).

Nel gruppo di studenti controllo rientrano infine tutti i soggetti non affetti da patologie respiratorie di natura allergica e che hanno risposto negativamente alle domande sull'asma e sulla rinite.

La prevalenza delle due patologie nel campione di riferimento è risultata rispettivamente pari al 13.2% (146/1100) per l'asma ed al 45.5% (501/1100) per la rinite.

Parallelamente, sono state inserite in banca dati per ciascuno studente (per un totale di 1092 soggetti), le informazioni relative alle analisi degli SPT per i 9 allergeni testati, elencati in Materiali e Metodi, e le informazioni relative ad altri sintomi o endofenotipi di natura allergica (*wheezing*, tosse notturna), dedotti dal questionario sulla salute respiratoria e sugli stili di vita (somministrato ad un totale di 1097 soggetti).

Ai campioni biologici prelevati (saliva e tampone orale), è stato assegnato un codice di identificazione univoco per ciascun individuo, a tutela del trattamento dei dati personali.

Analisi del DNA genomico

Dopo le procedure di estrazione, è stata effettuata un'analisi quantitativa e qualitativa del DNA genomico ottenuto, mediante lettura spettrofotometrica (rapporto OD260 e OD280), ed elettroforesi su gel d'agarosio (1% in TBE).

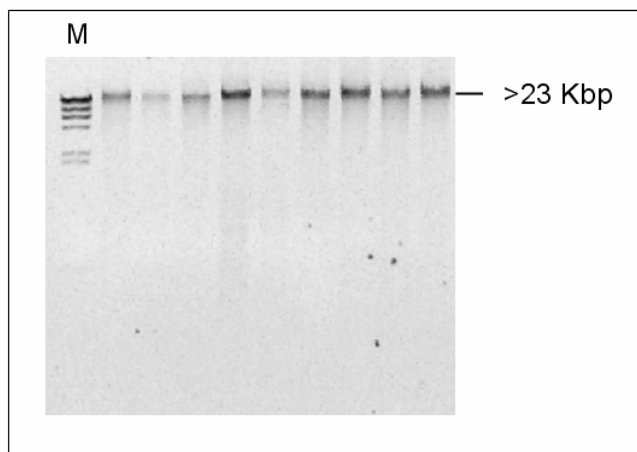


Figura 13. Elettroforesi su gel d'agarosio. M= λ HindIII

Come si può osservare dalla figura 13, sia la qualità che la quantità del DNA estratto e visualizzato in un campione rappresentativo di 9 individui, rispondono ai criteri utili per le successive analisi.

L'assenza di bande a più basso peso molecolare dimostra la qualità e l'integrità del DNA genomico. La quantità media di DNA genomico estratto per campione è pari a 2,1 μ g e la percentuale di successo di estrazione è pari al 100%.

Genotipizzazione

I dati relativi all'analisi genotipica dei due SNPs (rs4795400 ed rs7216389) localizzati sul gene GSDML, e dell'SNP rs8076131 localizzato su ORMDL3, sono stati raccolti ed analizzati mediante l'utilizzo del *software v.2.0* (ABI, Foster City, CA).

Al termine dell'analisi di Real Time PCR, il programma ha elaborato i dati ottenuti che sono stati visualizzati graficamente in un *plot di discriminazione allelica*. Nel plot, ogni genotipo analizzato ed attribuito con certezza, è specifico per ciascun individuo saggiato e si identifica con un cerchio colorato.

Nella figura 14 è mostrato un esempio rappresentativo di *plot di discriminazione allelica* ottenuto per il polimorfismo rs7216389 di GSDML. Il grafico mostra tre aree localizzate e

distinte con colori differenti, in cui sono raggruppati gli individui con lo stesso genotipo, e corrispondenti, ai tre genotipi attesi dall'analisi (omozigote per l'allele-1, eterozigote ed omozigote per l'allele-2).

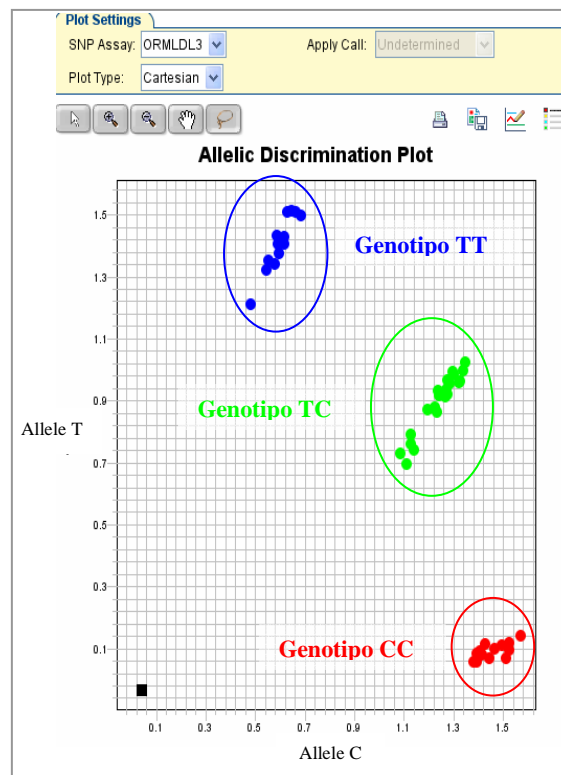


Figura 14. Diagramma di discriminazione allelica per l'*rs7216389* di GSDML.

Nel *plot*, relativo al polimorfismo *rs7216389* di GSDML, ogni singolo campione, è localizzato in un'area ben precisa e dipendente dalla quantità di fluorescenza emessa dalle sonde TaqMan®, in funzione della presenza degli alleli C o T. In ascissa sono registrati i valori di fluorescenza emessa in presenza dell'allele C e in ordinata è riportato il segnale di fluorescenza rilevato per l'allele T. Pertanto, i soggetti con genotipo CC saranno raggruppati in basso a destra (nessun segnale di fluorescenza per all'allele T). Analogamente, gli individui TT saranno visualizzati in alto a sinistra (nessuna emissione di fluorescenza corrispondente all'allele C), mentre gli eterozigoti localizzati al centro del *plot*, avranno un segnale di fluorescenza risultante dalla presenza di entrambi gli alleli, C e T. In basso a sinistra è rappresentato il controllo negativo, per il quale non si rileva nessun segnale di fluorescenza (contrassegnato con un quadratino nero).

Le informazioni ottenute da questo primo *screening*, hanno permesso di stratificare la popolazione di riferimento nelle tre classi genotipiche, relative a ciascuno dei tre SNPs analizzati.

I dati ottenuti dalle analisi di *genotyping* dell'intero campione, sono riportati nelle tabelle 2A, 2B e 2C.

Nelle tabelle si osserva che, la distribuzione del campione nelle tre classi (omozigote per l'allele-1, eterozigote ed omozigote per l'allele-2) risulta paragonabile fra i tre SNPs.

La percentuale di successo di estrazione è risultata pari al 98,5% per l'rs4795400, al 99,7% per l'rs7216389 ed al 98,7% per l'rs8076131.

A

<i>rs4795400 GSDML</i>	<i>N° di individui</i>	<i>%</i>
<i>Omozigoti TT</i>	173	16,0
<i>Eterozigoti TC</i>	537	49,5
<i>Omozigoti CC</i>	374	34,5
N° totale =	1084	
<i>Non determinati</i>	16	

B

<i>rs7216389 GSDML</i>	<i>N° di individui</i>	<i>%</i>
<i>Omozigoti CC</i>	206	18,8
<i>Eterozigoti CT</i>	538	49,0
<i>Omozigoti TT</i>	353	32,2
N° totale =	1097	
<i>Non determinati</i>	3	

C

<i>rs8076131 ORMDL3</i>	<i>N° di individui</i>	<i>%</i>
<i>Omozigoti GG</i>	182	16,8
<i>Eterozigoti GA</i>	539	49,6
<i>Omozigoti AA</i>	365	33,6
N° totale =	1086	
<i>Non determinati</i>	14	

Tabella 2. Dati riferiti alla genotipizzazione per i polimorfismi di GSDML (2A) e (2B) e di ORMDL3 (2C).
Suddivisione delle tre classi genotipiche e relative frequenze in percentuale.

Analisi statistiche

Prima di effettuare qualsiasi analisi di associazione, è stato necessario verificare se la popolazione di riferimento, formata da 1100 individui, fosse in equilibrio di *Hardy-Weinberg* (tabelle 3A, 3B e 3C).

Nelle tabelle 3A, 3B e 3C di seguito riportate, sono stati calcolati i valori delle frequenze attese per i tre genotipi, secondo la legge di *Hardy-Weinberg*: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, in cui p e q rappresentano le frequenze dei singoli alleli, nella popolazione presa in esame. Mediante il test del χ^2 è stato calcolato se le frequenze osservate differiscono da quelle teoriche:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{numero osservato} - \text{numero atteso})^2}{\text{numero atteso}}$$

I valori di χ^2 ottenuti sono uguali a: 0,735 per l'rs4795400, 0,001 per l'rs7216389 e 0,508 per l'rs8076131, e permettono di accettare l'ipotesi di partenza secondo cui non esiste differenza tra i gruppi esaminati, in relazione ai parametri considerati.

A

rs4795400 GSDML		
	<i>Freq. Attese%</i>	<i>Freq. Osservate%</i>
<i>Omozigoti TT</i>	16,6	16,0
<i>Eterozigoti TC</i>	48,3	49,5
<i>Omozigoti CC</i>	35,1	34,5
χ^2 Test	0,735	

B

rs7216389 GSDML		
	<i>Freq. Attese%</i>	<i>Freq. Osservate%</i>
<i>Omozigoti CC</i>	18,7	18,8
<i>Eterozigoti CT</i>	49,1	49,0
<i>Omozigoti TT</i>	32,2	32,2
χ^2 Test	0,001	

C

rs8076131 ORMDL3		
	<i>Freq. Attese%</i>	<i>Freq. Osservate%</i>
<i>Omozigoti GG</i>	17,3	16,8
<i>Eterozigoti GA</i>	48,6	49,6
<i>Omozigoti AA</i>	34,1	33,6
χ^2 Test	0,508	

Tabella 3. Frequenze attese, osservate e valore di χ^2 ottenuto per i polimorfismi di GSDML (3A) e (3B) e di ORMDL3 (3C).

I dati riportati dimostrano quindi, che le frequenze alleliche ottenute per i tre SNPs rispettano le proporzioni dell'equilibrio di *Hardy-Weinberg*; le varianti alleliche indagate non sono pertanto soggette ad importanti eventi di selezione e mutazione.

L'obiettivo successivo è stato quello di valutare l'eventuale relazione tra gli SNPs considerati e le patologie allergiche respiratorie nel campione di riferimento.

Associazione tra la regione 17q21 e le allergopatie respiratorie

Le informazioni derivate dai questionari somministrati agli studenti, sono state utilizzate per suddividere la popolazione in gruppi corrispondenti a diverse classi fenotipiche e per separare quindi, i soggetti “affetti” dai “non-affetti”, utilizzati come controlli.

Tale classificazione è fondamentale per effettuare le successive analisi statistiche (descritte in Materiali e Metodi), al fine di evidenziare differenze genotipiche tra i gruppi analizzati.

L'analisi di associazione dei tre SNPs con le patologie respiratorie oggetto di studio (asma e rinite), ha evidenziato una correlazione significativa con la rinite.

I dati di seguito riportati pertanto, sono relativi alle varianti polimorfiche nel sottogruppo dei soggetti rinitici, in relazione ai controlli sani (non affetti da patologie allergiche respiratorie).

In tabella 4 è riportata la distribuzione dei genotipi, espressa sia come valore numerico che come frequenza, all'interno delle due classi di soggetti presi in esame: “rinitici” e “non-rinitici”. Gli alleli evidenziati in grassetto e contrassegnati con l'asterisco, rappresentano gli alleli ancestrali per ciascun polimorfismo.

Locus/gruppo	Genotipo			
	n (%)			
rs4795400 (T/<u>C</u>*)	TT	TC	CC	N° totale di individui
Soggetti rinitici	45 (11)	217 (52,9)	148 (36,1)	410
Non affetti	127 (19)	318 (47,5)	224 (33,5)	669
rs7216389 (C/<u>T</u>*)	CC	CT	TT	n
Soggetti rinitici	57 (13,7)	220 (53)	138 (33,3)	415
Non affetti	148 (21,9)	316 (46,7)	213 (31,4)	677
rs8076131 (G/<u>A</u>*)	GG	GA	AA	n
Soggetti rinitici	50 (12,1)	220 (53,4)	142 (34,5)	412
Non affetti	131 (19,6)	317 (47,4)	221 (33)	669

Tabella 4. Distribuzione dei genotipi e relative frequenze nelle due classi analizzate: rinitici e non affetti.

Una prima analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software Stat-View 5.0.1, che ha permesso di effettuare un'analisi statistica bivariata, in cui ciascuna classe genotipica, è stata incrociata con uno dei fenotipi considerati nello studio. I risultati ottenuti sono stati visualizzati in tabelle di contingenza 2x2.

Tra le molteplici combinazioni considerate è emersa una forte associazione tra tutti e tre i polimorfismi analizzati (rs4795400, rs7216389, rs8076131) localizzati nella regione 17q21, e la rinite.

Tale risultato, è stato ulteriormente validato, incrociando le classi genotipiche di tutti e tre gli SNPs con alcuni endofenotipi associati alla rinite, dedotti dal questionario sulla salute respiratoria, tra cui: la *rinocongiuntivite* (rinite accompagnata dai segni tipici della congiuntivite, prurito agli occhi ed/o lacrimazione), la *rinite ever*, la *rinite associata ad allergia* (positività ad almeno uno degli SPT testati). L'associazione genetica è risultata nuovamente significativa, anche per le sottoclassi di soggetti numericamente meno abbondanti.

L'analisi di associazione è stata ripetuta con le stesse modalità per la patologia asmatica e dai dati ottenuti è emerso che, i polimorfismi considerati in questo studio, non sono associati all'asma in modo statisticamente significativo.

Numerosi dati di letteratura riportano l'associazione tra il *locus* cromosomico 17q21 e le patologie allergiche respiratorie, e prevalentemente con l'asma bronchiale. Nel campione di riferimento considerato invece, non si evince una correlazione significativa con il sottogruppo di soggetti asmatici.

Gli studi di genetica di popolazione risultano spesso estremamente variabili in relazione alle diverse etnie, alla localizzazione geografica ed a fattori di tipo ambientale.

Tuttavia, le discrepanze emerse in questo studio sono probabilmente correlate alla scelta del campione di riferimento. Lo studio di associazione è stato effettuato su un gruppo di studenti rappresentativo della popolazione generale, e non, su pazienti o su famiglie di soggetti affetti.

Nella popolazione analizzata infatti, il gruppo di soggetti asmatici risulta numericamente inferiore rispetto a quello dei rinitici, ciò determina una bassa prevalenza dell'asma nel campione di riferimento, che raggiunge un valore pari al 13.2%. La rinite invece, risulta maggiormente rappresentata ed ha una prevalenza pari al 45.5%. Questi valori spiegano la scarsa significatività delle analisi genetiche effettuate sul gruppo di soggetti asmatici e la mancata associazione con i polimorfismi della regione genomica considerata.

I dati ottenuti dalle analisi di associazione della rinite con i tre SNPs sono riassunti in tabella 5. La tabella riporta i valori dell'analisi genetica effettuata utilizzando sia il modello additivo (semplificato) che il modello non-additivo (o codominante).

Nel primo caso, l'eterozigote è accorpato ad uno dei due omozigoti. I dati sono quindi rispettivamente analizzati, per l'rs4795400 con modalità TC+CC verso l'omozigote TT, per l'rs7216389 con modalità CT+TT verso l'omozigote CC, e infine, per l'rs8076131 con modalità GA+AA verso l'omozigote GG. Nel modello non-additivo o codominante invece, si suppone che i due alleli vengano espressi in egual misura e l'analisi di associazione è effettuata separatamente per ciascuno dei tre genotipi.

SNPs	Modello	Genotipo	OR (95% CI)	P-value
rs4795400	Non-additivo	TT	1.00	Ref.
		TC	1.90 (1.29-2.80)	0.0011
		CC	1.87 (1.25-2.80)	0.0024
	Additivo	TC+CC	1.89 (1.30-2.74)	0.0008
rs7216389	Non-additivo	CC	1.00	Ref.
		CT	1.80 (1.26-2.57)	0.0012
		TT	1.68 (1.15- 2.46)	0.0070
	Additivo	CT+TT	1.76 (1.25-2.46)	0.0011
rs8076131	Non-additivo	GG	1.00	Ref.
		GA	1.83 (1.26-2.66)	0.0015
		AA	1.69 (1.14-2.51)	0.0090
	Additivo	GA+AA	1.77 (1.24-2.54)	0.0017

Tabella 5. Analisi di associazione dei tre SNPs con la rinite allergica.

Nella tabella 5 sono inoltre riportati i valori di *Odds Ratio* (OR) calcolati con *intervalli* di confidenza (CI) al 95%. Dai dati si osserva che, l'OR considerato per tutti e tre i polimorfismi è sempre maggiore di 1, senza nessuna discrepanza tra i due modelli analizzati (additivo, non-additivo).

Per valutare la significatività statistica dei dati ottenuti, è stato calcolato il *p-value*, che è risultato sempre compreso tra 0,001 e 0,05, e quindi fortemente significativo nell'intervallo di confidenza considerato (5%).

L'analisi di associazione dei tre polimorfismi con la rinite è stata effettuata mediante un modello di regressione logistica multivariata e corretta per tutti i fattori di rischio associati alla rinite, considerati nello studio, quali: sesso, familiarità all'asma, sensibilizzazione allergica, esposizione a fumo passivo (ETS), presenza di umidità nelle abitazioni ed esposizione a traffico pesante.

Come recentemente documentato da Cibella et al., la rinocongiuntivite, l'asma e l'eczema atopico, hanno numerosi fattori di rischio comuni. Dall'analisi condotta dal gruppo di ricerca dell'IBIM-CNR di Palermo è emerso che, tra i fattori di rischio significativamente associati alla rinocongiuntivite vi sono: l'atopia, l'asma, l'eczema, l'esposizione del soggetto a fumo passivo (ETS), la presenza di umidità nell'abitazione e l'esposizione a traffico pesante (Cibella F. 2011).

Nell'analisi di associazione dei tre SNPs (rs4795400, rs7216389 ed rs8076131) con la rinite, secondo il modello di regressione logistica pertanto, si è tenuto conto delle informazioni relative ai fattori di rischio considerati, che talvolta, possono essere definiti "confondenti" o "modificatori" degli effetti osservati.

Le informazioni relative alla storia familiare di asma per ciascun soggetto o all'esposizione a muffe/umidità nelle abitazioni, al fumo passivo, al traffico pesante, sono state dedotte dalle risposte degli studenti al questionario sulla salute respiratoria.

Gli studenti che hanno risposto affermativamente alla domanda riguardo la presenza di muffe, umidità o funghi sulle pareti di casa o sul soffitto della propria camera da letto sono stati classificati come "esposti"; l'esposizione al fumo passivo è stata valutata in relazione alla presenza di fumatori in casa; l'esposizione a traffico pesante è stata registrata in base alla frequenza con cui mezzi pesanti o camion circolano nelle strade della residenza durante i giorni della settimana; la familiarità all'asma è stata definita dalla presenza della patologia asmatica in almeno un genitore.

Osservando i dati riportati in tabella 5, si può concludere che, per ciascun SNP, c'è sempre una classe genotipica numericamente più abbondante nel gruppo di soggetti rinitici considerati, che risulta significativamente associata alla patologia in questione.

In dettaglio, i portatori dell'allele C (rispetto l'allele T) per l'rs4795400, sono associati ad un maggior rischio di insorgenza della rinite (OR = 1.90, 95% CI, 1.29–2.80, P = 0.0011 quando l'allele C è in singola copia; OR = 1.87, 95% CI, 1.25–2.80, P = 0.0024 quando l'allele è presente in due copie). Tale associazione si conferma nel modello additivo, in cui i soggetti portatori di una o due copie dell'allele C hanno un OR pari a 1.89 (95% CI, 1.30–2.74, P = 0.0008).

I risultati sono simili per l'rs7216389 (OR = 1.80, 95% CI, 1.26–2.57, P = 0.0012 quando è presente una copia dell'allele T; OR = 1.68, 95% CI, 1.15–2.46, P = 0.0070 quando sono presenti due copie; OR = 1.76, 95% CI, 1.25–2.46, P = 0.0011 nel caso del modello additivo in cui si considerano una o due copie dell'allele T) ed anche per l'rs8076131 (OR = 1.83, 95% CI, 1.26–2.66, P = 0.0015 quando è presente una copia dell'allele A; OR = 1.69, 95% CI, 1.14–2.51, P = 0.0090 quando sono presenti due copie; OR = 1.77, 95% CI, 1.24–2.54, P = 0.0017 per il modello additivo con una o due copie dell'allele A).

Riassumendo quindi, l'allele C per l'rs4795400, l'allele T per l'rs7216389, e l'allele A per l'rs8076131 risultano fortemente associati alla rinite nella popolazione considerata.

Dati recenti di letteratura riportano l'associazione tra gli SNPs presenti nella regione cromosomica 17q21 e l'asma bronchiale (Tavendale R. 2008).

Il polimorfismo rs7216389 è fin'ora il più studiato ed è stato associato all'insorgenza di asma, in diverse popolazioni. Tale SNP è localizzato nell'introne 1 del gene GSDML e la presenza dell'allele T influenza l'espressione del gene limitrofo ORMDL3 (Moffatt MF. 2007) attraverso meccanismi di rimodellamento della cromatina, allele specifici (Verlaan DJ. 2009). L'associazione del polimorfismo rs7216389 con l'asma infantile, è stata riportata per la prima volta da Moffatt (Moffatt MF. 2007) e successivamente confermata in altri studi indipendenti (Sleiman PM. 2008, Leung TF. 2009, Tavendale R. 2008). La variante T inoltre, è stata ritrovata nel 17% circa della popolazione asmatica europea.

La regione 17q21 contenente l'rs7216389, è stata anche associata ad altre patologie di natura allergica, come l'eczema atopico e a patologie di diversa eziologia, come il glioma.

In uno studio recente, il rischio di sviluppare il glioma è stato correlato alla condizione asmatica, sulla base di dati epidemiologici che associano il glioma ai polimorfismi della regione 17q21, suggerendo una relazione complessa tra allergia e cancro, possibilmente mediata da meccanismi immunologico-infiammatori (Dobbins SE. 2010).

Gli altri due polimorfismi considerati nel presente studio, l'rs4795400 e l'rs8076131, sono stati oggetto di *screening* soltanto in un'indagine di popolazione effettuata su famiglie francesi. Da questa analisi di associazione *genomewide* è emerso che, 11 SNPs (su 36 studiati), localizzati nel *locus* 17q21, risultano correlati al rischio di sviluppare asma in età infantile, soprattutto in soggetti maggiormente a rischio, perchè esposti a fumo passivo (ETS) durante i primi anni di vita.

I due SNPs rs4795400 ed rs8076131 risultano significativamente associati all'asma e gli alleli di rischio identificati sono rispettivamente l'allele C per l'rs4795400 e l'allele A per l'rs8076131.

Identificazione di un aplotipo di rischio nella regione 17q21

Gli alleli di rischio identificati nel presente progetto (l'allele C per l'rs4795400, l'allele T per l'rs7216389 e l'allele A per l'rs8076131), risultano in accordo con le evidenze sperimentali riportate in letteratura, e sono gli stessi alleli associati all'asma, negli altri studi di popolazione.

Da uno studio caso controllo effettuato sulla popolazione cinese in bambini di 11 anni, è emerso che 8 diversi marcatori polimorfici localizzati nella regione 17q21, risultavano associati all'asma, all'atopia ed ai livelli sierici di IgE totali. Contrariamente ad altri dati di letteratura, tra gli 8 SNPs risultati significativamente associati, l'rs7216389 era debolmente correlato alla patologia asmatica (Leung TF. 2009).

Nonostante numerose evidenze sperimentali dimostrino l'associazione dell'SNP rs7216389 all'asma, le frequenze alleliche di questo polimorfismo sono distribuite diversamente tra le popolazioni. Ad esempio, l'allele T risulta l'allele minore nelle popolazioni Europee, ma l'allele C è considerato l'allele minore negli studi su popolazioni extra Europee.

Sulla base dei dati riportati in questo studio, è possibile identificare un solo aplotipo **C-T-A** (rs4795400-rs7216389-rs8076131), di "massimo rischio", tra le 8 combinazioni di aplotipi possibili nel caso dei tre *locus* biallelici (2^3) considerati.

L'analisi dell'aplotipo C-T-A, in un modello di regressione logistica multivariata analogo al precedente, ha confermato che l'associazione con la rinite si mantiene statisticamente significativa ($P = 0.0014$) con un OR = 1.73, 95% CI, 1.24–2.42, e che i tre *loci* genici possono essere considerati in *linkage disequilibrium*.

I tre polimorfismi si collocano all'interno di due geni limitrofi, GSDML ed ORMDL3, localizzati nella regione q21 del cromosoma 17. L'SNP rs4795400 è quello che ha una posizione più centromerica e procedendo verso le estremità telomeriche si localizzano gli altri due SNP, l'rs7216389 e l'rs8076131, come mostrato in figura 15.

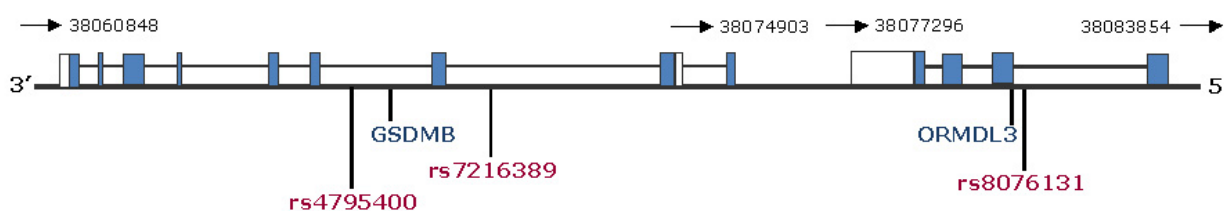


Figura 15. Organizzazione genomica di GSDML e ORMDL3 e localizzazione degli SNPs.

Soltanto uno studio di associazione genica effettuato sulla popolazione Danese ha valutato l'associazione dell'SNP rs7216389 con la rinite. I dati finali però, non associano in modo significativo il polimorfismo al rischio di rinite o di eczema, né alla sensibilizzazione allergica individuale (Bisgaard H., Bønnelykke K. 2010). Alcune varianti all'interno del *locus* 17q12-q21 risultano piuttosto associate al rischio di *wheezing* ricorrente, all'asma e all'iperresponsività bronchiale, sia in soggetti in età infantile che in età scolare.

Il ruolo biologico e il coinvolgimento funzionale di ORMDL3 nelle allergopatie respiratorie resta ancora da definire.

Un gruppo di ricerca giapponese ha dimostrato che l'espressione di ORMDL3 in fibroblasti polmonari normali è fortemente indotta dall'acido Polinosinico-Policitidilico, che fa parte dei pattern associati agli agenti microbici patogeni. Queste indicazioni suggeriscono che ORMDL3 potrebbe svolgere un ruolo importante nella difesa contro le infezioni virali respiratorie (Hirota T. 2008).

Il gene ORMDL3 codifica per la proteina trans membrana ORMDL3, localizzata nel reticolo endoplasmatico (RE) (Hjelmqvist L. 2002) e più volte associata ai meccanismi di traffico intracellulare e di *fold*ing proteico (Patil C. Walter P. 2001) (Hirota et al. 2008).

ORMDL3 è ampiamente espressa in diversi tessuti tra cui quello cardiaco, cerebrale, polmonare, epatico, renale e muscolare. Tuttavia, i livelli più elevati di proteina, sono stati ritrovati in cellule coinvolte nella risposta infiammatoria (Hjelmqvist L. 2002, Moffatt MF. 2007).

Recentemente, è stato definito più in dettaglio, il ruolo biologico della proteina ORMDL3 ed i possibili meccanismi molecolari che la correlano alle patologie infiammatorie. Sebbene ORMDL3 sia coinvolta nei meccanismi di *fold*ing proteico, questa proteina potrebbe modulare nel reticolo le vie di trasduzione del segnale Ca^{2+} dipendenti e partecipare alla risposta UPR (*Unfolded Protein Response*).

Tale spiegazione potrebbe essere alla base dei meccanismi patofisiologici che conducono all'infiammazione cronica e quindi all'asma.

Nelle patologie cronicoinfiammatorie come l'asma infatti, i linfociti T svolgono il duplice ruolo di iniziatori e di mediatori della risposta infiammatoria; la dimostrazione che la proteina ORMDL3 sia attivamente coinvolta nell'omeostasi del Ca^{2+} e nella risposta UPR in cellule T umane, potrebbe spiegare l'associazione più volte riportata in letteratura tra ORMDL3 e l'asma bronchiale (Cantero-Recasens G. 2010).

Le alterazioni nel ripiegamento delle proteine o nei livelli di Ca^{2+} presenti nel reticolo endoplasmatico infatti, causano la risposta UPR, un processo considerato induttore endogeno di infiammazione (Bertolotti A. 2000).

La comprensione del ruolo di alcuni fattori genetici nella risposta UPR, risulta particolarmente rilevante nelle malattie croniche infiammatorie come l'asma. ORMDL3 è un fattore di rischio associato all'asma ed altera l'omeostasi del calcio mediata dal reticolo, facilitando quindi, la risposta UPR. L'espressione eterologa di proteine ORMDL3 transmembrana nel RE, aumenta i livelli di Ca^{2+} citosolici e riduce nel RE il *signaling* mediato dal Ca^{2+} . Tale effetto si reverte inducendo la co-espressione di ORMDL3 e della pompa Ca^{2+} (SERCA), presente nel reticolo sarcoplasmatico. L'aumento di espressione di ORMDL3 inoltre, promuove l'attivazione di molecole di trasduzione del segnale della risposta UPR e di numerosi geni target. Il *knock-down* con siRNA di ORMDL3 endogeno invece, potenzia il rilascio di Ca^{2+} dal RE e diminuisce la risposta UPR (Cantero-Recasens G. 2010). Gli autori quindi, sviluppano un modello secondo cui ORMDL3 lega ed inibisce la pompa SERCA, riducendo la concentrazione di Ca^{2+} nel reticolo ed aumentando la risposta UPR; tale meccanismo molecolare potrebbe essere alla base dell'associazione di ORMDL3 con le patologie infiammatorie.

In conclusione, sebbene ORMDL3 sia stato ripetutamente associato a patologie infiammatorie come l'asma o a numerose malattie croniche intestinali come il morbo di Crohn, saranno necessari ulteriori studi per delineare e comprendere i meccanismi cellulari e molecolari che conducono alla patofisiologia delle malattie proinfiammatorie.

Analisi della variante A313G del gene GSTP1

Parallelamente allo *screening* della regione 17q21, sullo stesso campione è stata effettuata un'analisi di genotipizzazione per il polimorfismo A313G del gene GSTP1, mediante *SnapShoot Multiplex System* (ABI, Foster City, CA).

E' stato dimostrato che l'omeostasi delle vie aeree, regolata dall'attività enzimatica delle GSTs, è un fattore chiave in soggetti affetti da asma severa.

Le proteine GSTs infatti, svolgono un ruolo cruciale nella difesa antiossidante, sono essenziali per l'omeostasi del glutatione (Hayes JD., McLellan LI. 1999) e per la protezione cellulare dai prodotti dello stress ossidativo (Hayes JD. 2005, Yin Z. 2000).

Le GSTs appartengono ad una superfamiglia di enzimi di fase II, altamente espressi nel tessuto polmonare, più volte associate alla patogenesi dell'asma, alla difesa ossidativa, al metabolismo degli xenobiotici ed alla detossificazione cellulare degli idroperossidi (Strange RC. 2001).

Le varianti funzionali della GSTP1, tra cui l'rs1695 (A313G), sono state associate all'asma bronchiale in alcuni studi (Aynacioglu AS. 2004, Tamer L. 2004), ma non tutti i dati di letteratura correlano significativamente tale variante con la patologia asmatica (Brasch-Andersen C. 2004, Mak JC. 2007).

La sostituzione Iso105Val di GSTP1, così come il genotipo *null* di GSTM1, sono state entrambe considerate sia protettive (Aynacioglu AS. 2004), che fattori di rischio (Tamer L. 2004) in studi di associazione all'asma.

L'inconsistenza di tali dati di letteratura potrebbe avere diverse spiegazioni, incluse le differenze nella storia e nella patogenesi dell'asma sia in età infantile che in età adulta, gli effetti combinati di altre varianti note di GSTP1 sia nella regione codificante che nel promotore, o ancora la co-presenza di varianti polimorfiche funzionali, in altri enzimi della famiglia GSTs (Kamada F. 2007).

Ad ogni modo, la stretta relazione tra i geni coinvolti nella difesa agli agenti ossidanti, allo stress ossidativo e l'asma, è supportata da numerose evidenze di interazione tra i geni implicati nella difesa ai fattori ambientali e la patogenesi dell'asma bronchiale (London SJ. 2007).

La variante 313 A>G infatti, è stata oggetto di numerosi studi di associazione e considerata un fattore di rischio per l'insorgenza dell'asma (Aynacioglu AS. 2004). Il polimorfismo 313 A>G è localizzato nell'esone 5 del gene GSP1, e determina la sostituzione di un'isoleucina con una valina nel codone 105 della proteina. La sostituzione I104V, risulta in una sostanziale

riduzione dell'attività catalitica dell'enzima ed una diminuita capacità di detossificazione. Il residuo 104 infatti, si trova all'interno del sito H, un dominio catalitico dell'enzima, essenziale nell'interazione della GSTP1 con i substrati elettrofili (Ji X. 1999).

Il dato maggiormente interessante, emerso da un'analisi preliminare di associazione di questo polimorfismo con i fenotipi oggetto di studio, è stata l'individuazione di una correlazione tra i tre SNPs della regione 17q21, ed il polimorfismo A313G del gene GSTP1.

Dall'analisi di associazione mediante tabelle di contingenza 2x2 è emerso che, quando il campione di riferimento è prima suddiviso in funzione dei genotipi di GSTP1 (AA, AG, GG), l'associazione dei tre SNPs nella regione 17q21 con la rinite, rimane statisticamente significativa, solo quando la sottoclasse di riferimento per GSTP1 presenta il genotipo AG (e si perde invece quando il sottogruppo di riferimento è AA o GG).

La stessa associazione non casuale, si ripete con identica modalità se si associano i tre SNPs all'asma bronchiale (*asthma ever*). Quindi, soltanto nella sottocategoria di soggetti in cui è presente il genotipo AG per GSTP1, l'asma bronchiale risulta significativamente associata ai tre SNPs, con un *p-value* pari a 0,024 per l'rs4795400; P= 0,048 per l'rs7216389; P=0,053 per l'rs8076131.

Questi dati di associazione, sebbene risultino statisticamente significativi, sono stati analizzati in un gruppo di soggetti numericamente ristretto. La genotipizzazione del campione per l'rs1695 di GSTP1 infatti, è stata effettuata solo su 828 soggetti (su 1100 totali).

Inoltre, per effettuare le analisi di associazione è stato necessario stratificare ulteriormente il campione, suddividendolo in funzione del genotipo di GSTP1 e dividendo ancora queste sottoclassi per i genotipi di ciascun polimorfismo della regione 17q21 (GSDML, ORMDL3).

Per tale ragione, se la stessa analisi di associazione si ripete utilizzando il modello additivo per GSTP1, in cui l'omozigote GG viene accorpato all'eterozigote AG (quindi AA vs AG+GG), l'associazione degli rs4795400, rs7216389, rs8076131 con l'asma e con la rinite si mantiene statisticamente significativa.

Nel modello non-additivo precedentemente riportato invece, l'unica associazione significativa tra gli SNPs e l'asma o la rinite, si ottiene quando il campione è stratificato in funzione dell'eterozigote AG di GSTP1. In tal caso infatti, la suddivisione del campione nella sottoclasse GG, numericamente sottorappresentata rispetto AG o AA, determina la perdita di associazione dei tre SNPs con le malattie respiratorie.

Questi dati preliminari fanno supporre che, la presenza dell'allele G (rs1695) nel gene GSTP1 potrebbe influenzare l'associazione dei tre SNPs con l'asma e con la rinite.

Come documentato in letteratura, alcuni geni possono agire da “modificatori” su altri geni e variare il coefficiente di rischio di insorgenza di varie patologie, come nel caso di GSTM1 e GSTP1.

Indagini di popolazione più ampie saranno necessarie per correlare la variante GSTP1 alle patologie allergiche respiratorie oggetto di studio e confermare il dato epidemiologico.

Conclusioni (I)

Riassumendo, i dati ottenuti dall'analisi di popolazione effettuata, hanno fatto emergere un'associazione fortemente significativa tra la rinite ed i tre polimorfismi, localizzati nei geni GSDML ed ORMDL3.

Più precisamente, la presenza degli alleli C (rs4795400), T (rs7216389) e A (rs8076131) sia in eterozigosi che in omozigosi, risulta un fattore di rischio per l'insorgenza della rinite.

Tale dato è stato ulteriormente validato e confermato dall'analisi di associazione effettuata considerando il "massimo rischio" possibile, ovvero una condizione in cui il soggetto eredita l'intero aplotipo C-T-A.

Il presente studio di genetica di popolazione, si inquadra all'interno di un progetto più ampio finalizzato al monitoraggio degli effetti dell'ambiente sulle patologie respiratorie, che si avvale di un'analisi multiparametrica ed interdisciplinare effettuata da più unità operative, e commissionata dall'ente ARPA-Sicilia.

L'analisi delle varianti genetiche comparate con il profilo fenotipico dei soggetti reclutati, ha permesso di valutare la totalità dei dati clinici, genetici e fenotipici raccolti, con parametri più precisi e personalizzati e di correlare tutti questi dati con il rischio di sviluppare allergopatie respiratorie.

In questa prospettiva, lo studio integrato dell'esposizione ad agenti inquinanti o ad agenti biologici sporo-pollinici, in rapporto alla valutazione di indicatori genetici di maggiore suscettibilità, costituisce un elemento di grande importanza nell'area di intervento ambiente e salute e rappresenta uno strumento utile alla programmazione di azioni mirate ed efficaci sull'ambiente e di medicina preventiva e terapeutica.

RISULTATI E DISCUSSIONE (II)

EFFETTI DI DEPS ED ALLERGENI IN CELLULE A549

Effetti dei DEPs e dell'estratto di Pj sulla vitalità cellulare

Gli effetti citotossici dei DEPs e dell'estratto proteico di *Parietaria judaica* sono stati valutati mediante colorazione delle A549 con *Cristal Violetto* (come descritto in Materiali e Metodi) dopo 24 e 48 ore di trattamento.

La curva di proliferazione mostrata in figura 16A riporta i dati relativi al trattamento delle A549 con l'estratto proteico di Pj alle concentrazioni di 50, 100, 250 e 500 μ g/ml. Come si osserva dal grafico, nessuna delle dosi considerate ha un effetto tossico sulle A549 dopo 24 e 48 ore di trattamento. Si evidenzia inoltre, che la concentrazione più alta di estratto proteico (500 μ g/ml), induce un aumento della proliferazione di circa il 25% nelle A549 trattate rispetto al controllo dopo 24 ore di trattamento, e di circa il 40% dopo 48 ore.

In figura 16B è riportata la curva di crescita delle A549 trattate con SRM1975 alle concentrazioni di 1, 10, 20 e 40 μ g/ml. In accordo con i dati presenti in letteratura (Calcabrini A. 2004), dosi elevate di DEPs (40 μ g/ml) risultano tossiche per le cellule epiteliali, e riducono la vitalità cellulare rispetto al controllo di circa il 40% già dopo 24 ore di trattamento, e di quasi il 60% dopo 48 ore.

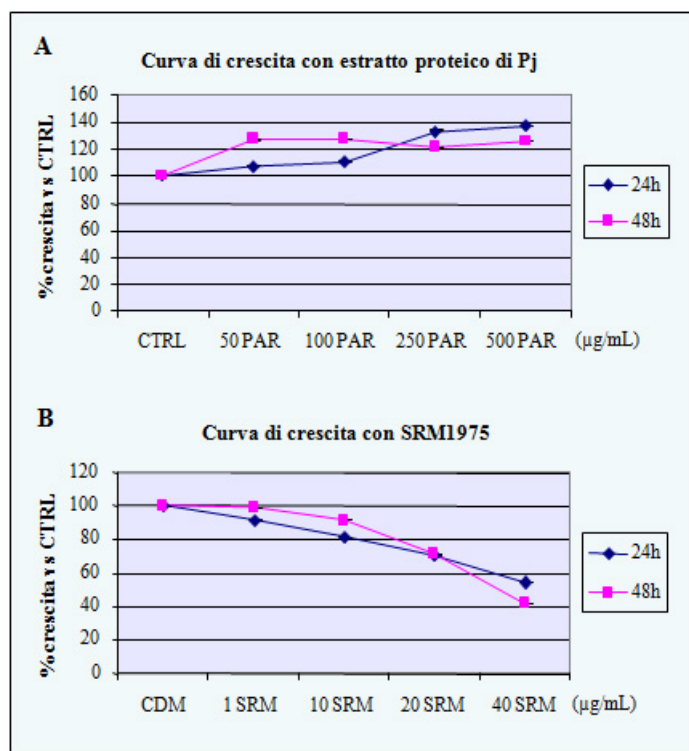


Figura 16. Curva dose-risposta delle A549 trattate con dosi crescenti di SRM1975 (A) ed estratto proteico di *Parietaria judaica* (B) per 24 e 48 ore.

Sulla base dei risultati descritti, la dose di DEPs fissata ed utilizzata per gli esperimenti successivi sarà pari a 20µg/ml, per un tempo di trattamento non superiore alle 24 ore. Le dosi di estratto proteico di Pj scelte per i trattamenti singoli e combinati, saranno rispettivamente pari a 500 e 250 µg/ml. Per la valutazione degli effetti combinati del particolato aereo e del polline in cellule di epitelio bronchiale umano, tutti gli esperimenti successivi saranno effettuati pre-incubando le A549 per 24 ore con 20µg/ml di SRM1975 in RPMI all'1% FBS, e successivamente trattando le cellule per 24 o 48 ore con estratto proteico di Pj in assenza di siero, alle dosi di 500 e 250 µg/ml.

Effetti dei DEPs e degli allergeni di Parietaria sulla permeabilità epiteliale

Analisi del citoscheletro

In molti studi *in vitro* è stato dimostrato che DEPs ed allergeni riescono a penetrare attraverso il monostrato epiteliale e che l'inalazione di concentrazioni elevate di materiale particolato può alterare le funzioni respiratorie nell'uomo. Il monostrato epiteliale è infatti un'importante barriera strutturale e funzionale, che protegge il sistema respiratorio dagli inquinanti aerei di varia natura.

I dati preliminari del presente progetto, hanno validato l'ipotesi secondo cui, l'esposizione combinata ad allergeni e DEPs aumenta la permeabilità del monostrato cellulare e favorisce il passaggio di sostanze attraverso l'epitelio respiratorio.

Le analisi di immunocitochimica, mediante marcatura del citoscheletro di actina con falloidina-rodaminata hanno evidenziato, modificazioni morfologiche nelle A549 dopo trattamento combinato con SRM1975 ed estratto proteico di polline.

Nelle immagini di microscopia a fluorescenza riportate in figura 17 si osserva infatti una riorganizzazione dei filamenti di actina, la fessurazione del monostrato epiteliale e la perdita delle interazioni cellula-cellula.

In dettaglio, nel pannello di immagini è rappresentato: in A il controllo (A549 in diclorometano e terreno al 2% FBS per 24 ore); in B e C sono riportati i singoli trattamenti con la dose massima di estratto proteico di Pj (500µg/ml) (B) e con l'SRM1975 alla concentrazione di 20µg/ml (C) per 24 ore; in D ed E sono mostrati i trattamenti combinati effettuati sulle A549 pre-trattate con l'SRM1975 alla dose 20µg/ml e con l'estratto proteico di polline alle concentrazioni di 250µg/ml (D) e di 500µg/ml (E).

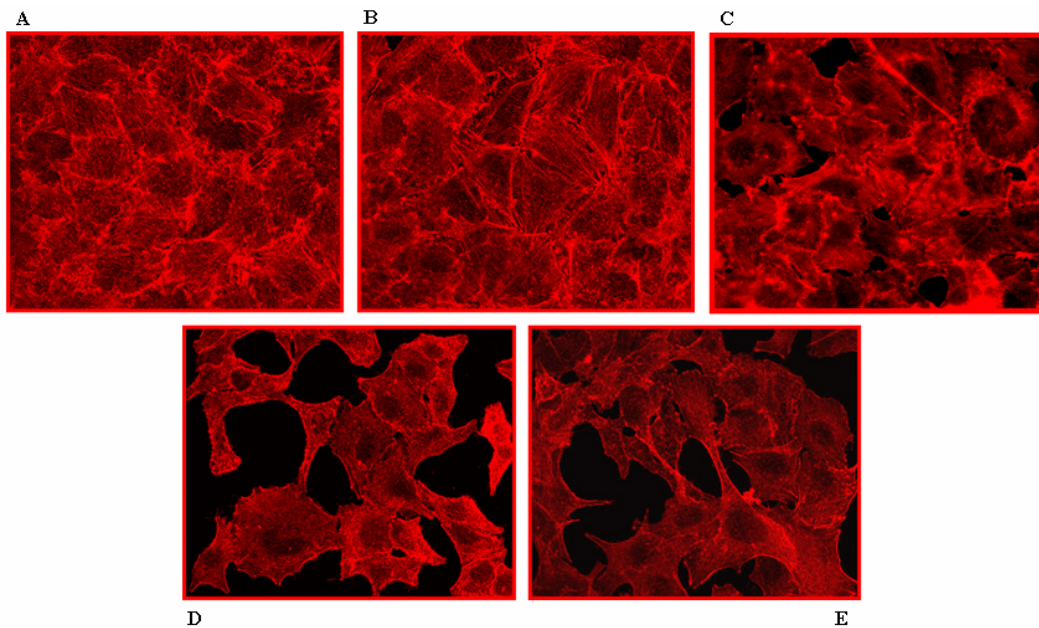


Figura 17. Analisi morfologica delle A549 mediante marcatura dei filamenti del citoscheletro di actina con falloidina-rodaminata. Acquisizione delle immagini al microscopio confocale con ingrandimento 60x.

Sulla base dei dati riportati, dopo 24 ore di trattamento si osserva che, in (A) e (B) viene mantenuta l'integrità del monostrato e la morfologia classica delle cellule epiteliali in adesione. Il singolo trattamento con l'estratto proteico di *Parietaria* (B) infatti, non altera la morfologia delle A549 che risultano paragonabili al controllo (A). In (C) si osserva che l'effetto singolo del trattamento con DEPs, determina una lieve fessurazione del monostrato epiteliale. Il risultato è accentuato nei doppi trattamenti (D ed E), in cui la presenza di ampi spazi tra le cellule, favorisce lo *spreading* delle A549. La combinazione di allergeni e miscele di DEPs potrebbe quindi esercitare un'azione sinergica in cellule di epitelio polmonare.

E' stato dimostrato che, tali sostanze, aderiscono alla superficie epiteliale e vengono internalizzate dalle cellule.

Numerosi dati di letteratura evidenziano che, l'esposizione delle A549 al particolato fine ($PM_{2.5}$) determina cambiamenti morfologici e funzionali in cellule di epitelio polmonare. La linea cellulare A549 è considerata un buon modello di studio per le interazioni tra le particelle ambientali e la superficie epiteliale delle vie aeree (Don Porto Carero A. 2001); tuttavia, i problemi connessi al fenotipo maligno delle A549 possono essere superati assumendo che, gli effetti avversi causati dall'esposizione al particolato ambientale, avrebbero implicazioni più severe in individui maggiormente suscettibili (Dick CA. 2003), come ad esempio in soggetti affetti da neoplasia polmonare.

In cellule di epitelio polmonare, il particolato fine, altera la superficie cellulare ed il monostrato epiteliale, determina cambiamenti nella morfologia cellulare, causa il distacco e la

retrazione delle cellule, che assumono una morfologia più tondeggianti, soprattutto dopo esposizioni prolungate.

Le particelle che aderiscono alla superficie cellulare sembrano seguire la contrazione dei corpi cellulari e concentrarsi in aggregati sulla superficie cellulare. Il materiale amorfo (PM_{2.5}) infatti, è stato osservato all'interno di strutture vacuolari nel citosol e prevalentemente in prossimità dei filamenti del citoscheletro.

Tutte queste indicazioni suggeriscono che, gli inquinanti ambientali aderiscono alla superficie epiteliale e successivamente vengono internalizzati dalle cellule. Una volta all'interno del citoplasma le particelle finiscono e perturbano l'organizzazione strutturale del citoscheletro, inducendo modificazioni a livello dei filamenti di actina e tubulina (Calcabrini A. 2004). Tali elementi che caratterizzano la componente "dinamica" del citoscheletro (i filamenti intermedi ne rappresentano la componente "strutturale"), sono responsabili di numerose funzioni cellulari.

I cambiamenti nell'organizzazione del citoscheletro potrebbero essere promossi da un gran numero di fattori differenti, tra cui la presenza di specie reattive dell'ossigeno citosoliche in grado di agire come secondi messaggeri intracellulari ed attivare vie di traduzione del segnale (Calcabrini A. 2004).

Le modalità con cui il particolato fine possa modificare l'architettura citoscheletrica, tuttavia, rimangono ancora da definire.

Dai dati riportati in letteratura emerge che, il citoscheletro è il *target* principale delle particelle ambientali inalate, inclusi gli allergeni pollinici.

L'attività diretta o indiretta delle peptidasi del polline infatti, distrugge le *tight junctions* e favorisce il passaggio di allergeni e di altre sostanze attraverso l'epitelio respiratorio (Runswick S. 2007).

In un altro sistema *in vitro* costituito da cellule endoteliali di microvascolatura polmonare (HMVEC-L) è stato osservato che, l'esposizione a 250µg/ml di estratto proteico di Pj, determina un riarrangiamento dei filamenti di actina e la diminuzione delle fibre da stress presenti nel citoplasma. Il trattamento con l'estratto pollinico, induce nelle HMVEC-L, cambiamenti nella morfologia cellulare e nell'integrità del monostrato endoteliale, la perdita dei contatti cellula-cellula, ed il conseguente aumento della permeabilità *in vitro*.

Gli stessi autori, hanno osservato che gli effetti del polline riportati sulle HMVEC-L, risultano reversibili dopo incubazione con inibitori di proteasi (pepstatina, EDTA e bestatina), confermando quindi, l'azione specifica delle proteasi del polline di Pj sull'endotelio respiratorio (Taverna S. 2008).

L'azione citotossica combinata di inquinanti ambientali e proteine del polline determina quindi, modificazioni morfologiche in cellule bronchiali, che potrebbero essere collegate ad alterazioni funzionali ed all'attivazione di vie di trasduzione del segnale in risposta alle particelle inalate.

Effetti dei DEPs e del polline sull'espressione dell'E-caderina

Valutazione dell'espressione genica e dei livelli di proteina totali

L'analisi delle modificazioni delle interazioni cellula-cellula in cellule epiteliali bronchiali, in risposta all'esposizione agli inquinanti ambientali, potrebbe dipendere dalla variazione della localizzazione di specifiche molecole di adesione che regolano la coesione cellulare, così come la permeabilità a ioni e macromolecole.

L'E-caderina ad esempio, è una molecola di riconoscimento e di adesione cellulare calcio dipendente, localizzata a livello della membrana plasmatica, espressa nei tessuti epiteliali e coinvolta nelle interazioni cellula-cellula caratteristiche delle giunzioni aderenti.

Alcune proteine citoplasmatiche, come le α - e β -catenine, legano il dominio citoplasmatico dell'E-caderina (Reynolds AB. 1994), formando un complesso sulla membrana plasmatica, essenziale per l'adesione cellula-cellula (Nagafuchi A. 1994). Inoltre, le molecole di E-caderina, legano i filamenti di actina del citoscheletro e tale interazione risulta importante nell'assemblaggio delle giunzioni aderenti.

L'E-caderina quindi, svolge un ruolo nella risposta al danno cellulare e nei meccanismi di riparazione delle cellule epiteliali polmonari, attraverso il controllo dell'architettura tissutale ed il mantenimento dell'integrità strutturale.

I dati precedentemente riportati, evidenziano alterazioni nell'integrità della barriera epiteliale dopo trattamento con le particelle inquinanti e con il polline.

Sulla base di queste indicazioni sperimentali, sono stati valutati nelle A549, i livelli di E-caderina presenti (mRNA e proteina), dopo trattamento con DEPs ed estratto di proteine del polline di Pj. Come mostrato in figura 18, l'espressione del mRNA per l'E-caderina, ottenuta dalle analisi di Real Time PCR, è influenzata dal doppio trattamento con SRM1975 ed estratto proteico di polline. Dopo 24 ore di trattamento con la dose di 20 μ g/ml di SRM1975 l'E-caderina risulta già *down*-regolata rispetto al controllo (CDM). Il trattamento combinato con 20 μ g/ml di SRM1975 e 250 o 500 μ g/ml di estratto di polline induce un'ulteriore decremento dei livelli di messaggero per l'E-caderina, in modo dose dipendente. Gli stessi

risultati sono stati ottenuti incubando le cellule con l'estratto proteico di Pj per 6 ore e per 12 ore (dati non mostrati).

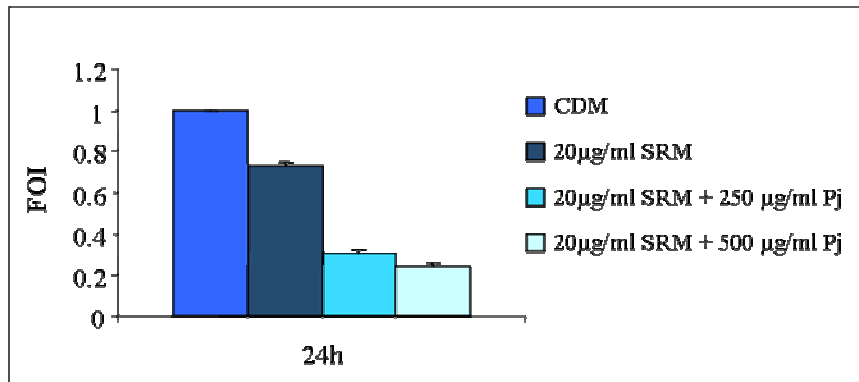


Figura 18. Espressione genica dell'E-caderina in cellule A549 trattate per 24 ore. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

Le successive analisi di *western blot* effettuate su estratti proteici totali di A549, hanno confermato la diminuzione di espressione proteica dell'E-caderina (figura 19). Nella prima *lane* è riportato il controllo delle A549 (CDM); nella seconda *lane*, le A549 sono state mantenute 24 ore in presenza del singolo trattamento con 500µg/ml di estratto proteico di Pj; nelle ultime due *lane* sono riportati i doppi trattamenti con SRM1975 e con 250µg/ml (terza *lane*) e 500µg/ml (quarta *lane*) di proteine di Pj.

Nelle ultime due condizioni si osserva una riduzione nell'espressione dell'E-caderina, maggiore del 20%. In figura 19B è riportata l'analisi densitometrica, espressa in termini di percentuale rispetto al controllo di caricamento (β -actina) e normalizzata rispetto al CDM, considerato come 100%.

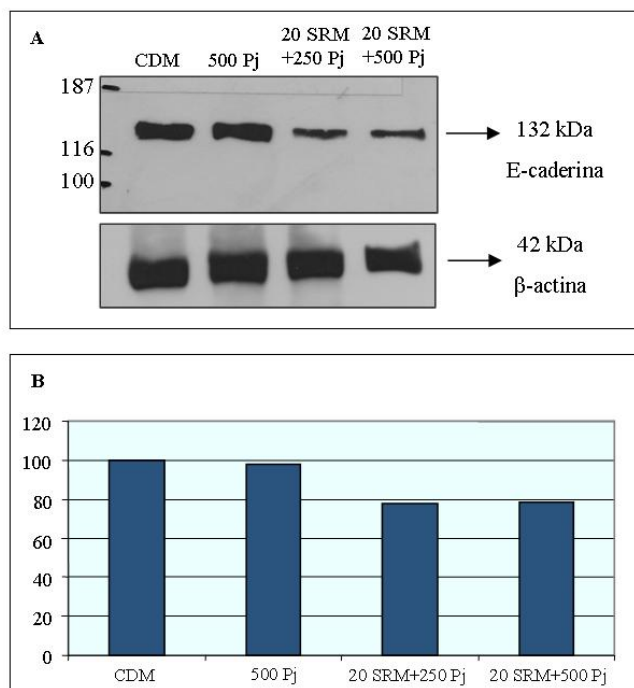


Figura 19. Analisi di western blot dell'E-caderina in A549 trattate. Controllo di *loading* β -actina (A). Analisi quantitativa dell'E-caderina normalizzata rispetto la β -actina (B).

I dati ottenuti dimostrano che, l'espressione dell'E-caderina nelle A549 trattate è influenzata prevalentemente dall'effetto del trattamento coi DEPs. Sebbene i livelli di messaggero diminuiscano in modo dose dipendente nei trattamenti combinati con SRM1975 ed estratto di polline, l'espressione proteica dell'E-caderina sembra quasi esclusivamente dipendente dal trattamento con SRM1975. Ulteriori esperimenti saranno necessari per confermare la diminuzione di espressione dell'E-caderina su estratti proteici di membrana e citoplasmatici delle A549, trattate con DEPs e proteine del polline.

Studi precedenti effettuati sulle A549, hanno dimostrato *in vitro* il distacco delle cellule epiteliali dal substrato in seguito al trattamento con estratto proteico di Pj. Una delle ipotesi più accreditate attribuisce tale effetto alla presenza di proteasi del polline di Parietaria, ed in particolare alla peptidasi-Pj, coinvolta nella degradazione proteolitica di molecole di adesione essenziali per le interazioni tra le cellule e per l'integrità del monostrato. In cellule di epitelio bronchiale, è stata osservata infatti, una notevole degradazione dell'occludina (*tight-junction*), associata ad un effetto proteolitico anche sull'E-caderina (*adherens-junction*). La degradazione dell'E-caderina risulta minore rispetto a quella dell'occludina, probabilmente perchè le giunzioni aderenti sono strutturalmente localizzate dietro le giunzioni strette e sono pertanto meno accessibili agli effetti proteolitici (Cortes L. 2006).

Parallelamente, gli studi sugli effetti degli inquinanti ambientali hanno dimostrato che, il danno epiteliale indotto dal fumo di tabacco, determina variazioni nell'espressione e nella localizzazione dell'E-caderina. In cellule epiteliali (AECs) esposte ad estratto di fumo di sigaretta (CSE) è stato osservato che, il trattamento con basse dosi di CSE diminuisce l'espressione dell'E-caderina a livello della membrana plasmatica, e determina invece un aumento della proteina nel citoplasma (Wang X. 2000).

Tra le numerose fonti di inquinanti ambientali, i PAHs, sono i principali costituenti sia degli scarichi provenienti dagli autoveicoli a benzina e diesel, che dei prodotti derivanti dalla combustione del condensato di fumo di sigaretta (Ding YS. 2008, Kawanaka Y. 2007).

DEPs e CSE pertanto, hanno alcune componenti chimiche bioattive comuni e gli effetti biologici da essi indotti, spesso si sovrappongono.

I dati di letteratura confermano quindi, gli effetti degli inquinanti ambientali sulla variazione dell'espressione di molecole di adesione importanti per il mantenimento delle interazioni cellula-cellula e per le funzionalità della barriera epiteliale.

Analisi di immunofluorescenza

Gli esperimenti di immunofluorescenza effettuati sulle A549, hanno evidenziato la delocalizzazione dell'E-caderina, dopo trattamento combinato di 24 ore con 20µg/ml di SRM1975 e con 250µg/ml di estratto proteico di polline. In figura 20 si osserva rispettivamente, nel controllo (A) e nel singolo trattamento con la dose 250µg/ml di proteine del polline (C), la localizzazione dell'E-caderina a livello della membrana cellulare; la perdita di questa localizzazione comincia ad essere apprezzabile già nel singolo trattamento con 20µg/ml dell'estratto diesel SRM1975 (B) e raggiunge l'effetto massimo nel doppio trattamento con DEPs e 250µg/ml di estratto di polline (D).

Nei trattamenti combinati con SRM1975 ed estratto proteico di polline di Pj quindi, la perdita dell'E-caderina dalla membrana cellulare determina una rilocalizzazione della molecola nello spazio intracellulare.

Tale effetto è stato recentemente confermato anche in cellule endoteliali esposte ai DEPs, in cui è stata osservata la perdita di localizzazione della VE-caderina dalla membrana plasmatica. Alla massima concentrazione di DEPs pari a 100µg/ml, la VE-caderina non è presente nelle giunzioni aderenti e risulta quasi totalmente localizzata a livello intracellulare (Chao MW. 2010).

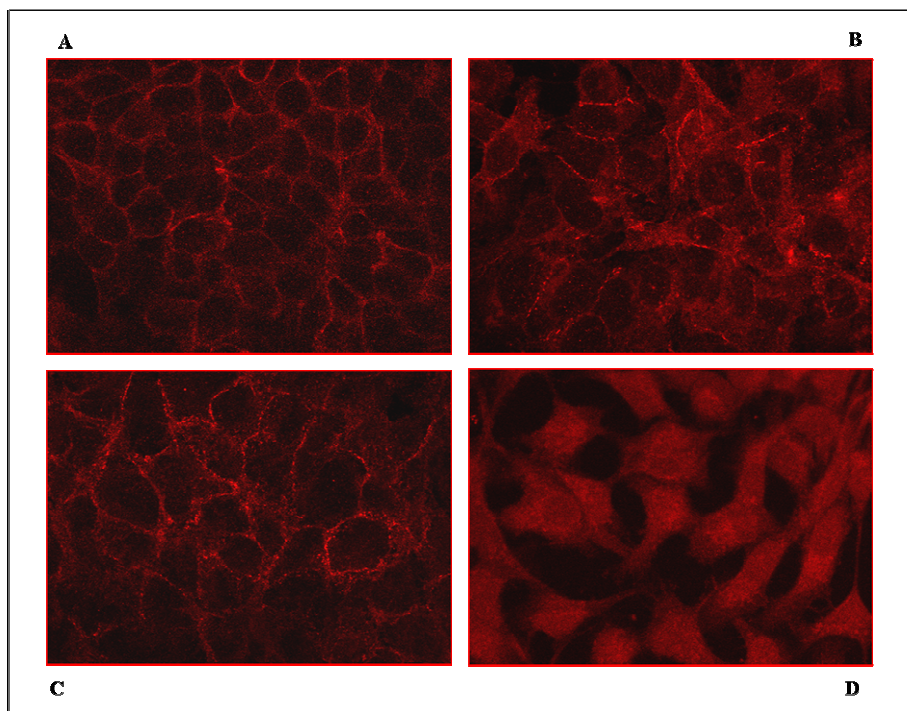


Figura 20. Immunofluorescenza dell'E-caderina in cellule A549. Acquisizione delle immagini al microscopio confocale con ingrandimento 60x.

Effetti dei DEPs e dell'estratto di *Parietaria* sulla localizzazione della β -catenina

Analisi di immunofluorescenza

La coda intracellulare dell'E-caderina si lega alla β -catenina sul versante citoplasmatico della membrana cellulare, formando un complesso caderina-catenina, che ancora l'E-caderina ai filamenti del citoscheletro. La localizzazione della β -catenina regola i meccanismi di proliferazione cellulare e di inibizione da contatto; in cellule a confluenza è legata all'E-caderina e si localizza a livello della membrana plasmatica, quando la densità cellulare aumenta, la β -catenina si dissocia dal complesso con l'E-caderina e trasloca a livello subcellulare o nucleare (Dietrich C. 2002).

La perdita di localizzazione dell'E-caderina, ha come conseguenza il distacco della β -catenina dalla membrana plasmatica e la traslocazione a livello citoplasmatico o nucleare.

La β -catenina nel nucleo, lega i fattori di trascrizione LEF (*lymphoid enhancer factor*) e TCF (*T-cell factor*) inducendo un aumento nell'espressione dei geni *target*, inclusi quelli coinvolti nell'attivazione dei linfociti T (Huang H., He X. 2008), (Qiang YW., Rudikoff S. 2004).

La traslocazione della β -catenina è stata osservata sulle A549 trattate, mediante analisi di immunofluorescenza. In figura 21 sono riportate le immagini acquisite al microscopio a fluorescenza in cui si osserva che nel controllo CDM (A) e nel trattamento singolo con la dose di 500 μ g/ml di estratto di Pj (B), la β -catenina è localizzata a livello della membrana cellulare. Nel trattamento singolo con 20 μ g/ml di DEPs (C), ed in quello combinato con DEPs ed estratto proteico di polline di Pj alle dosi rispettivamente di 250 μ g/ml e 500 μ g/ml (D, E), la proteina perde la sua localizzazione di membrana e si localizza a livello periplasmatico e citoplasmatico.

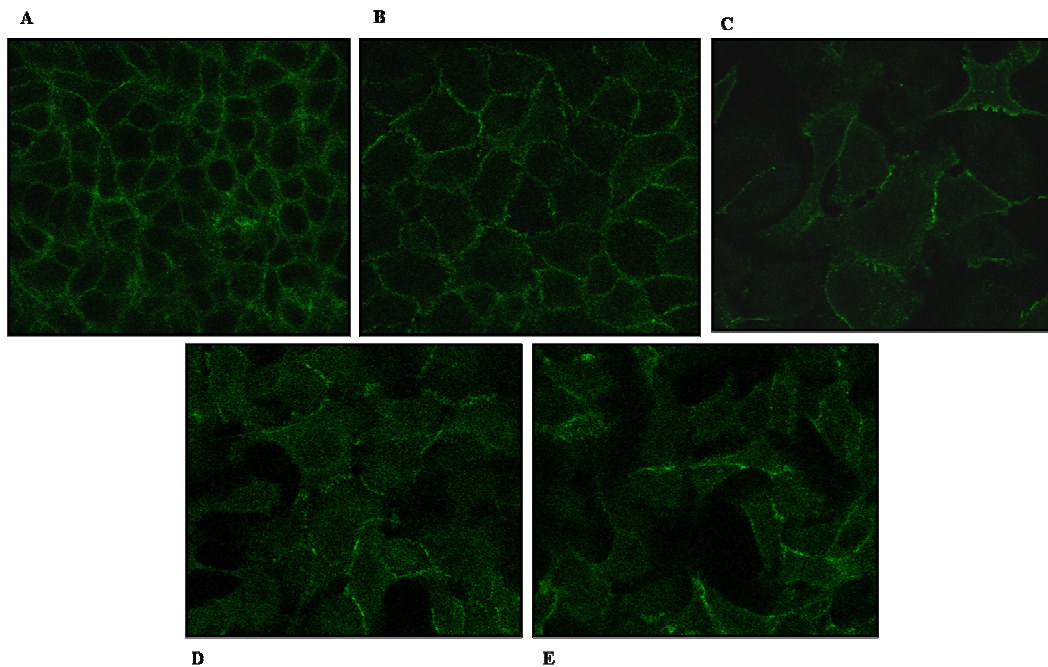


Figura 21. Immunofluorescenza della β -catenina in cellule A549. Acquisizione delle immagini al microscopio confocale con ingrandimento 60x.

I risultati ottenuti sono in accordo con i dati presenti in letteratura; in uno studio effettuato sulle A549 è stato infatti osservato che il trattamento con CSE (*cigarette smoke extract*) promuove l'accumulo di β -catenina a livello nucleare e citoplasmatico, attraverso l'inibizione della GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3beta*). La GSK3 β nello stato attivo infatti, è responsabile della degradazione della β -catenina attraverso il proteasoma (Tian D. 2009).

De Boer e collaboratori hanno dimostrato che, l'espressione di E-caderina e di α -catenina in soggetti affetti da asma allergica, risulta significativamente inferiore rispetto ai controlli non asmatici. I livelli minori di α -catenina osservati inoltre, sono risultati inversamente correlati ai valori di eosinofili presenti nell'epitelio. Le analisi di immunistochemica effettuate sugli stessi campioni, hanno anche evidenziato la presenza di β -catenina a livello nucleare, in accordo col suo ruolo di fattore di trascrizione (de Boer WI. 2008).

La traslocazione della β -catenina al nucleo e l'attivazione del *signaling* β -catenina/TCF/LEFs in cellule di epitelio bronchiale, risulta quindi correlata ai processi di riparazione dell'epitelio in risposta agli inquinanti esterni e ai meccanismi infiammatori scatenati dalle reazioni allergiche (Zhu M. 2007).

Effetti dei DEPs e delle proteine di *Parietaria* sulla motilità delle A549

Wound healing assay

Il rimodellamento del citoscheletro osservato negli esperimenti precedenti, è strettamente legato ai meccanismi di adesione tra le cellule ed alle loro capacità motili, essenziali sia nei

processi fisiologici che in quelli patologici. A questo proposito, per valutare variazioni nella motilità cellulare delle A549 dopo trattamento con DEPs ed estratto di *Parietaria*, sono stati effettuati saggi di *wound healing* e di motilità con camera di Boyden.

Gli esperimenti di *wound healing* hanno dimostrato la minore capacità motile delle A549 nei trattamenti combinati, evidenziando un effetto di inibizione dose dipendente della motilità cellulare, già apprezzabile dopo 24 ore di co-trattamento con DEPs e proteine del polline, e maggiormente evidenziabile dopo 48 ore.

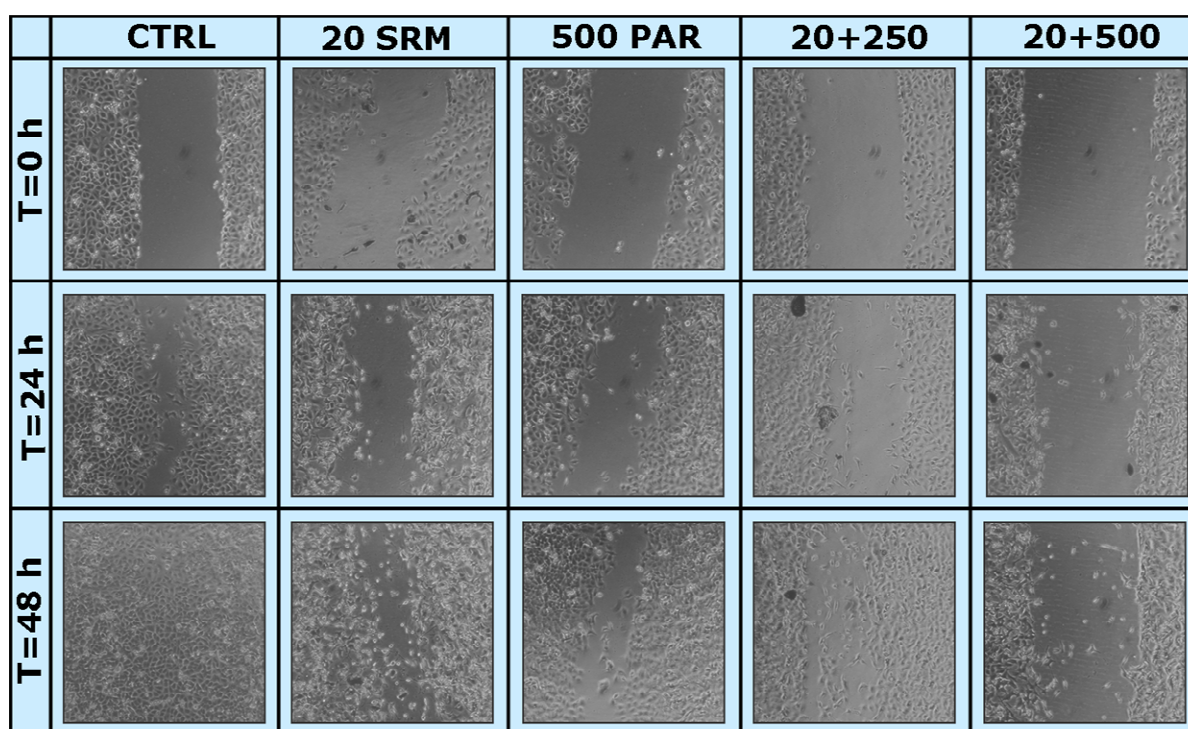


Figura 22. Wound healing assay su A549 trattate con SRM1975 ed estratto di proteine del polline di Pj.

Come si nota dal pannello di foto riportato in figura 22, le A549 non trattate riparano completamente il taglio effettuato sul monostrato, dopo 48 ore dallo *scratch*. Nei singoli trattamenti con 20µg/ml di SRM1975 e 500µg/ml di estratto proteico di polline, si osserva un'inibizione della motilità cellulare rispetto al controllo, dopo 24 e 48 ore. L'effetto dei trattamenti combinati determina un'inibizione della motilità cellulare in modo dose e tempo dipendente. Le cellule risultano quasi completamente inibite nel doppio trattamento con 20µg/ml di SRM1975 e 500µg/ml di proteine di Pj.

La ridotta capacità delle A549 di riparare la 'ferita' *in vitro*, dopo trattamento con particelle diesel ed estratto proteico di *Parietaria*, conferma la perdita dell'integrità epiteliale e

delle regolari funzioni cellulari ed è indicativa di un danno all'epitelio causato dal contatto con gli inquinanti.

Studi effettuati da Doornaert e collaboratori hanno evidenziato che, il trattamento con DEPs ha un effetto negativo sull'adesione e sulla capacità di riparare lo *scratch* in cellule di epitelio bronchiale umano (HBE). L'esposizione ai DEPs infatti, altera il legame tra i filamenti di actina del citoscheletro e la matrice extracellulare, determinando una riduzione nell'espressione di molecole di adesione (integrina α_3 , β_1 e CD44), e riducendo in modo dose dipendente la motilità cellulare nei saggi di *wound healing* (Doornaert B. 2003).

La minore capacità motile delle cellule epiteliali osservata nel saggio di *wound healing*, è probabilmente il risultato sia della riduzione della proliferazione cellulare indotta dai DEPs, che di variazioni nella composizione della matrice extracellulare, in cui sono coinvolte le metalloproteasi di matrice (MMP).

I dati di letteratura riportano che, altre particelle inquinanti tra cui l'arsenico, prevalentemente assunto per inalazione o ingestione, danneggiano le funzioni della barriera epiteliale. L'inibizione della capacità di rimarginare la lesione, in cellule epiteliali bronchiali (16HBE14o-) trattate con dosi crescenti di arsenico, è stata correlata ad una riduzione dello *spreading* e della migrazione cellulare. Tale effetto è risultato inoltre, dipendente dall'aumento di espressione e di attività della MMP-9, una proteasi importante nella regolazione delle funzioni polmonari (Olsen CE. 2008).

Saggio di motilità con camera di Boyden

Le osservazioni morfologiche dei saggi di *wound healing*, sono state parzialmente confermate dagli esperimenti di motilità cellulare con camera di *Boyden*.

Dopo 6 ore di incubazione, è stata effettuata la conta delle cellule migrate attraverso la membrana di policarbonato. I dati ottenuti, hanno evidenziato una diminuzione della motilità delle A549 pre-trattate con 20 μ g/ml di SRM1975 e con 250 e 500 μ g/ml di estratto di polline, di circa il 60% rispetto al controllo. Nel grafico mostrato in figura 23A, è calcolata la percentuale di A549 migrate rispetto al controllo (CDM). In figura 23B e C sono mostrate le immagini della membrana di policarbonato utilizzata negli esperimenti con camera di *Boyden*, dopo colorazione con *Cristal Violetto*. Si osserva che, la migrazione delle A549 attraverso i pori della membrana, è notevolmente più abbondante nel controllo (B) rispetto al doppio trattamento con 20 μ g/ml di SRM1975 e con 500 μ g/ml di estratto di Pj (C).

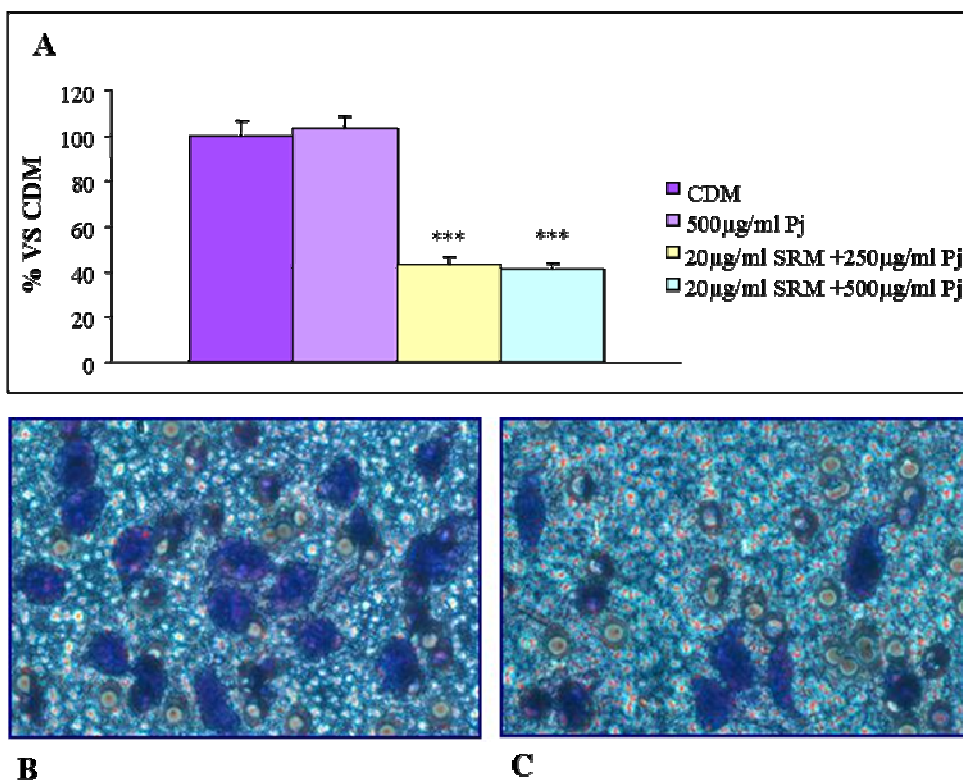


Figura 23. Saggio di motilità cellulare effettuato con camera di Boyden in cellule A549.
 (A) Percentuale di cellule migrate rispetto al controllo. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard. *** $P < 0.001$.
 (B) Ingrandimento 40x delle A549 migrate nel controllo, (C) dopo trattamento con 20 µg/ml di SRM e 500 µg/ml di Pj.

In questo caso, l'effetto principale sulla capacità motile delle cellule epiteliali è attribuibile al trattamento con la miscela di DEPs. L'estratto di proteine del polline a concentrazioni crescenti (250 e 500 µg/ml) infatti, non inibisce la migrazione delle A549 in modo dose dipendente.

Il risultato ottenuto dagli esperimenti di motilità con camera di Boyden non risulta perfettamente in accordo con i saggi di *wound healing* mostrati precedentemente. Negli esperimenti di *wound healing* infatti, oltre alle capacità motili delle cellule epiteliali, sono coinvolti anche i meccanismi di adesione delle cellule al substrato che, come dimostrato precedentemente, risultano importanti nella risposta delle cellule epiteliali ai danni indotti dagli inquinanti aerei. Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere correlata alla necessità di tempi di osservazione diversi nei due saggi. Nel caso del *wound healing*, gli effetti di richiusura del taglio sono apprezzabili dopo 24 e 48 ore di trattamento, mentre, per i saggi di motilità è necessario un tempo di incubazione più breve (6 ore) per escludere che la migrazione delle A549 sia dipendente esclusivamente dall'effetto del chemoattrattante.

Tali spiegazioni potrebbero essere alla base delle discrepanze osservate, in risposta ai trattamenti combinati con estratto diesel e proteine del polline di Parietaria.

Aumento di mediatori solubili e di molecole di adesione coinvolte nella risposta immunologico-infiammatoria

Espressione genica dell'interleuchina-8

Come già dimostrato, DEPs ed allergeni danneggiano l'epitelio bronchiale e le ciglia, limitando gli effetti protettivi della barriera epiteliale. Le particelle che attraversano il monostrato epiteliale entrano facilmente in contatto con le cellule del sistema immunitario stimolando la sintesi di citochine e chemochine infiammatorie, sia in cellule epiteliali che in cellule circolanti.

L'espressione di mediatori pro-infiammatori indotta dai DEPs, è controllata da vie di trasduzione del segnale che attivano fattori di trascrizione come AP-1 e NFκB. Numerosi studi supportano l'ipotesi che i DEPs, promuovono i meccanismi di infiammazione polmonare attraverso la via delle MAP-chinasi, l'attivazione di AP-1 ed NFκB, inducendo la sintesi ed il rilascio di mediatori pro-infiammatori da parte dell'epitelio respiratorio. Tra questi mediatori è presente l'interleuchina-8, un potente attivatore dei neutrofili con effetti chemotattici, spesso utilizzata come marcatore biologico dei meccanismi infiammatori polmonari indotti da contaminanti ambientali.

L'espressione di IL-8 risulta positivamente modulata dopo trattamento combinato con 20μg/ml di SRM1975 per 24 ore e con estratto proteico di *Parietaria judaica* per 12 e 24 ore.

Come si osserva dal grafico, i livelli di messaggero dell'IL-8 non aumentano dopo 6 ore di trattamento combinato.

I dati di Real Time PCR in figura 24, mostrano un aumento dell'RNA messaggero di IL-8 già dopo 12 ore trattamento combinato con 20μg/ml di SRM1975 ed estratto proteico di Pj e lo stesso effetto si ottiene anche dopo 24 ore di trattamento.

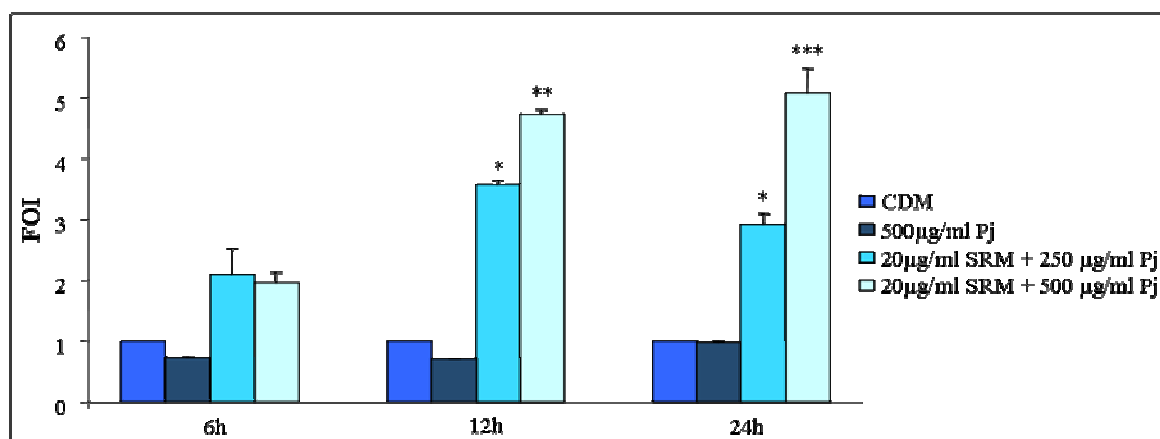


Figura 24. Espressione genica di IL8 nelle A549 trattate con SRM1975 ed estratto proteico di Pj. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. *** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05.

L'effetto osservato risulta dose dipendente ed evidenzia un'azione sinergica del doppio trattamento con SRM1975 ed estratto proteico di Parietaria.

I DEPs e le miscele di DEPs-PAHs (*Polyaromatic Hydrocarbons*) agiscono in sinergia con gli allergeni, aumentando la produzione di IgE specifiche e di citochine Th2 (Diaz Sanchez D. 1997).

Fahy e collaboratori hanno dimostrato che l'azione sinergica del trattamento con DEPs e con l'allergene dell'acaro della polvere Der p1 (*Dermatophagoides pteronyssinus*), induce la secrezione di IL-8 in cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs) di soggetti allergici. Gli autori osservano inoltre un incremento di MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*) e di RANTES, dimostrando che gli effetti combinati di DEPs ed allergeni amplificano la risposta infiammatoria locale ed il reclutamento degli elementi cellulari infiammatori (Fahy O. 2000).

Aumento di espressione di ICAM-1

Gli esperimenti di PCR Real Time hanno dimostrato che il trattamento combinato con DEPs ed allergeni, stimola l'espressione genica di IL-8 in cellule epiteliali bronchiali. L'aumento dei livelli di IL-8, è spesso associato all'induzione di molecole di adesione coinvolte nella risposta immunologico-infiammatoria. Tra queste, ICAM-1 (CD54), è una molecola di adesione appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline, che svolge un ruolo cruciale nella regolazione delle risposte infiammatorie locali polmonari. Alti livelli di ICAM-1 solubile, sono stati infatti ritrovati nel siero e nei lavaggi broncoalveolari di molte patologie infiammatorie polmonari, inclusa l'asma.

La regolazione di questa molecola di adesione potrebbe essere correlata agli effetti adjuvanti dei DEPs.

E' noto che i DEPs, inducono l'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB, coinvolto nella regolazione dell'espressione genica dell'interleuchina-8. Il gene di ICAM-1 ha specifici siti di legame per NF-kB, nella regione del promotore. Pertanto è possibile che, l'aumento di espressione genica dell'IL-8, a sua volta indotta dall'attivazione di NF-kB da parte dei DEPs, possa essere coinvolta nell'*up*-regolazione di ICAM-1 (Takizawa H. 2000).

Nelle A549 trattate con SRM1975 ed estratto proteico di Pj, si osserva un'aumento dose dipendente dell'espressione di ICAM-1.

I dati di Real Time PCR riportati in figura 25, mostrano un aumento dell'RNA messaggero di ICAM-1 dopo 12 e 24 ore di trattamento combinato con 20µg/ml di SRM1975 ed estratto

di Pj. Come si nota dal grafico, il singolo trattamento con 20µg/ml di SRM1975 non influenza i livelli di messaggero di ICAM-1 per nessuno dei tempi considerati.

Analogamente a quanto dimostrato per l'interleuchina-8, non è apprezzabile un aumento di ICAM-1 dopo 6 ore di trattamento, mentre, l'effetto osservato nel doppio trattamento a 12 e 24 ore, evidenzia un'azione sinergica dei DEPs e delle proteine del polline di *Parietaria judaica*.

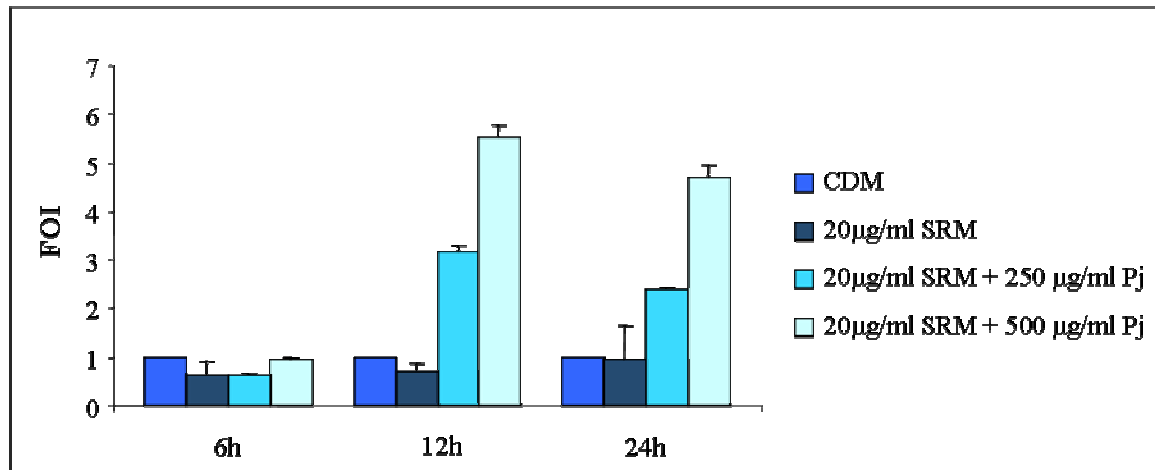


Figura 25. Espressione genica di ICAM1 nelle A549 trattate con SRM1975 ed estratto proteico di Pj. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

Dati di letteratura riportano un aumento di espressione di ICAM-1 in soggetti affetti da rinocongiuntivite e sensibilizzati alla *Parietaria judaica*. Gli esperimenti effettuati su cellule di epitelio nasale di pazienti allergici alla *Parietaria judaica*, hanno dimostrato, l'incremento di espressione di ICAM-1 nei periodi di massima sensibilizzazione pollinica. La valutazione citologica della mucosa degli stessi soggetti, ha confermato una notevole infiltrazione di eosinofili, neutrofilo e di cellule metacromatiche nei pazienti allergici, rispetto ad un gruppo di volontari non allergici (Ciprandi G. 1994).

La molecola di adesione ICAM-1 svolge infatti un ruolo importante nell'accumulo delle cellule infiammatorie, inclusi i neutrofilo, gli eosinofili e i linfociti T. Tosi e collaboratori hanno dimostrato che l'adesione dei neutrofilo al monostato epiteliale è regolata dall'interazione specifica con ICAM-1 e che, il trattamento con l'anticorpo bloccante anti-ICAM-1, impedisce il legame diretto dei neutrofilo alle cellule epiteliali (Tosi MF. 1992).

ICAM-1 è coinvolta quindi, sia nella risposta agli stimoli infiammatori di natura allergica che nei meccanismi di *signaling* cellulare indotti dall'esposizione ai DEPs.

Reclutamento di componenti cellulari pro-infiammatorie

Saggio di adesione dei PMN al monostrato epiteliale

Al fine di validare il ruolo biologico dell'overespressione di ICAM-1 e di IL-8 nel reclutamento delle componenti cellulari infiammatorie, sono stati effettuati saggi di adesione dei polimorfonucleati al monostrato di A549 trattate con DEPs ed estratto proteico di Pj.

In figura 26 si osserva che, il numero dei PMN che aderiscono al monostrato epiteliale, aumenta in misura contenuta nel caso dei singoli trattamenti, raggiungendo circa il 50% in più rispetto al controllo, nel doppio trattamento con SRM1975 e 250µg/ml di polline.

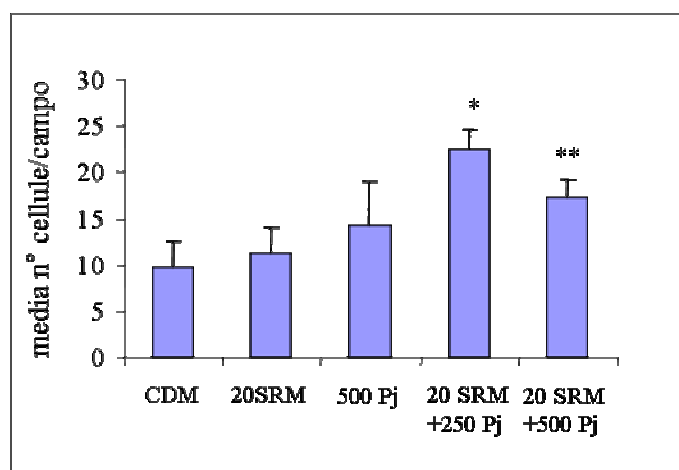


Figura 26. Saggio di adesione dei PMN al monostrato di A549. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard. ** P<0.01, * P<0.05.

Dopo tre ore di adesione, il trattamento combinato con DEPs e proteine del polline di Parietaria aumenta il numero di polimorfonucleati adesi al monostrato epiteliale.

L'aumento dell'adesione dei PMN al monostrato epiteliale, risulta correlato all'aumento di espressione di ICAM-1 nelle A549 trattate. Anche l'overespressione di interleuchina-8, potrebbe aumentare significativamente la chemiotassi di neutrofili, basofili e linfociti T al sito di flogosi.

Gli esperimenti di adesione dei polimorfonucleati (PMN) al monostrato di A549 trattate con DEPs ed estratto pollinico, hanno confermato i dati di espressione genica ottenuti, sottolineando il ruolo cruciale di IL-8 ed ICAM-1 nella migrazione e nel reclutamento delle componenti cellulari infiammatorie.

L'adesione dei PMN alle cellule epiteliali umane delle vie aeree attraverso l'interazione con la molecola ICAM-1 è un meccanismo importante nelle patologie respiratorie di natura infiammatoria. In cellule epiteliali tracheali (TEC ed 9HTEo-) è stato dimostrato che,

l'inibizione di ICAM-1 con un anticorpo monoclonale, riduce di circa il 50% l'adesione dei neutrofilo al monostrato cellulare. Al contrario, la stimolazione con IL-1 o TNF- α , induce un aumento nell'espressione di ICAM-1 di circa 4 *fold*, ed il conseguente aumento di adesione dei PMN alle cellule epiteliali. Gli stessi autori hanno dimostrato, che anche l'inibizione di specifiche glicoproteine di adesione espresse sulla superficie dei PMN che interagiscono con ICAM-1 (CD11a, CD11b, e CD18), determina una riduzione dell'adesione dei neutrofilo al monostrato di cellule epiteliali (Tosi MF. 1992).

Taguchi e collaboratori hanno dimostrato in colture epiteliali primarie, che l'adesione e la trasmigrazione dei linfociti T è regolata dall'interazione tra l'antigene LFA-1, espresso sulla superficie delle cellule T, e la molecola ICAM-1, presente sulla superficie epiteliale (Taguchi M. 1998).

L'overespressione di ICAM-1 sulla superficie epiteliale apicale e la secrezione di alti livelli di chemochina RANTES, facilitano la migrazione delle cellule infiammatorie attraverso un gradiente chemiotattico epiteliale e la successiva adesione dei linfociti T alle cellule *target*.

I *patterns* coinvolti nel reclutamento delle componenti infiammatorie in cellule epiteliali risultano finemente regolati. I dati riportati pongono le basi per comprendere come questo processo sia coordinato a livello immunologico, soprattutto in condizioni di risposta a stimoli infiammatori allergici o ad inquinanti ambientali.

Conclusioni (II)

I risultati ottenuti confermano l'ipotesi secondo cui i DEPs interagiscono con gli allergeni aerodispersi, potenziando la risposta infiammatoria indotta dalla reazione allergica.

Gli esperimenti *in vitro* effettuati sulle A549 hanno infatti dimostrato che, gli effetti adjuvanti di tali particelle e delle proteine del polline inducono variazioni morfologiche e strutturali in cellule di epitelio bronchiale che alterano le funzioni protettive della barriera epiteliale.

Il trattamento con DEPs e proteine di *Parietaria* induce inoltre la delocalizzazione dell'E-caderina, una molecole di adesione importante nel mantenimento dei contatti cellula-cellula. Il distacco delle giunzioni cellulari e la conseguente delocalizzazione della β -catenina favorisce l'ingresso di sostanze attraverso l'epitelio ed attiva numerose vie di trasduzione del segnale intracellulari coinvolte nei meccanismi infiammatori.

Le modificazioni morfologiche e funzionali indotte dal trattamento combinato con DEPs ed allergeni influenzano anche le capacità motili delle A549 e aumentano la secrezione di mediatori infiammatori e citochine con effetti chemotattici.

L'*up*-regolazione di IL-8 e di ICAM-1 osservata sulle A549 dopo trattamento combinato, induce l'attivazione dei neutrofili aumentando la chemiotassi delle cellule infiammatorie che aderiscono al monostrato epiteliale.

I numerosi meccanismi immunologici che si attivano in seguito all'inalazione di materiale particolato e di allergeni risultano ancora non del tutto chiari. L'individuazione e la corretta integrazione dei *network* che regolano le risposte allergiche ai contaminanti ambientali, potrebbe permettere di identificare i fattori coinvolti nella patogenesi dell'asma e di contenere il rapido incremento nell'insorgenza delle allergie respiratorie.

La stretta relazione tra infiammazione allergica e l'inquinamento ambientale potrebbe essere alla base della severità dei sintomi osservati nei soggetti allergici. L'esacerbazione delle patologie allergiche-respiratorie potrebbe dipendere dall'azione sinergica di più stimoli e dall'attivazione di numerose vie di trasduzione del segnale intracellulari che amplificano le risposte infiammatorie polmonari.

BIBLIOGRAFIA:

- Alessandro R. et al. Production of an egg yolk antibody against *Parietaria judaica* 2 allergen. *Poult Sci.* 2009.
- Altshuler D. et al. A haplotype map of the human genome. *Nature.* 2005.
- Altshuler D. et al. Genetic mapping in human disease. *Science.* 2008.
- Asher MI et al. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J.* 1995.
- Asher MI et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet.* 2006.
- Asturias JA. et al. Par j 1 and Par j 2, the major allergens from *Parietaria judaica* pollen, have similar immunoglobulin E epitopes. *Clin Exp Allergy.* 2003.
- Aynacioglu AS. et al. Protective role of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Val105Val genotype in patients with bronchial asthma. *Br J Clin Pharmacol.* 2004.
- Ayuso R. et al. Isolation by mAb based affinity chromatography of two Par j I isoallergens. Comparison of their physicochemical, immunochemical and allergenic properties. *Mol Immunol.* 1993.
- Bateman ED. et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J.* 2008.
- Baye TM. et al. Application of genetic/genomic approaches to allergic disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 2010.
- Bayram H. et al. Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *J Allergy Clin Immunol.* 1998.
- Bertolotti A. et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000.
- Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature.* 2007.
- Bisgaard H, Bønnelykke K. Long-term studies of the natural history of asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2010.
- Bogdanović O. Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma.* 2009.
- Boland S. et al. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. *Am J Physiol.* 1999.

- Bolt HM. Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab.* 2006.
- Bousquet J. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy.* 2008.
- Bouzigon E. et al. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. *N Engl J Med.* 2008.
- Brasch-Andersen C. et al. Possible gene dosage effect of glutathione-s-transferases on atopic asthma: Using real-time pcr for quantification of gstm1 and gstt1 gene copy numbers. *Hum Mutat.* 2004.
- Bray MS. Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. *J Appl Physiol.* 2000.
- Burr ML. et al. Effects on respiratory health of a reduction in air pollution from vehicle exhaust emissions. *Occup Environ Med.* 2004.
- Calcabrini A. et al. Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells. *Environ Res.* 2004.
- Cantero-Recasens G. et al. The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Hum Mol Genet.* 2010.
- Chao MW. et al. Diesel exhaust particle exposure causes redistribution of endothelial tube VE-cadherin. *Toxicology.* 2010.
- Cibella F. et al. Proportional Venn diagram and determinants of allergic respiratory diseases in Italian adolescents. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011.
- Ciprandi G. et al. Evidence of intercellular adhesion molecule-1 expression on nasal epithelial cells in acute rhinoconjunctivitis caused by pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol.* 1994.
- Colombo P. et al. Identification of an immunodominant IgE epitope of the *Parietaria judaica* major allergen. *J Immunol.* 1998.
- Colombo P. et al. The allergens of *Parietaria*. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003.
- Cookson W. et al. Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat Rev Genet.* 2009.
- Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature.* 1999.
- Cookson WO. et al. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet.* 1989.
- Corbi AL, Carreira J. Identification and characterization of *Parietaria judaica* allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1984.

- Cortes L. et al. Purification of a novel aminopeptidase from the pollen of *Parietaria judaica* that alters epithelial integrity and degrades neuropeptides. *J Allergy Clin Immunol*. 2006.
- D'Amato G. et al. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*. 2007.
- D'Amato G. et al. Environmental risk factors (outdoor air pollution and climatic changes) and increased trend of respiratory allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2000.
- D'Amato G. et al. Environmental risk factors and allergic bronchial asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005.
- D'Amato G. et al. Pollen-related allergy in Europe. *Allergy*. 1998.
- D'Amato G. et al. Thunderstorm-asthma and pollen allergy. *Allergy*. 2007.
- D'Amato G. et al. Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010.
- de Boer WI. et al. Altered expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: possible role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008.
- Demoly P, Bousquet J. The relation between asthma and allergic rhinitis. *Lancet*. 2006.
- Diaz Sanchez D. et al. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol*. 1997.
- Dick CA. et al. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol*. 2003.
- Dietrich C. et al. Subcellular localization of beta-catenin is regulated by cell density. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002.
- Ding YS. et al. Levels of tobacco-specific nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from different tobacco varieties. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008.
- Dockery DW and Stone PH. Cardiovascular risks from fine particulate air pollution. *N Engl J Med*. 2007.
- Don Porto Carero A. et al. Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ Mol Mutagen*. 2001.
- Donaldson K. et al. Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol Lett*. 1996.
- Doornaert B. et al. Negative impact of DEP exposure on human airway epithelial cell adhesion, stiffness, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003.

- Duffy DL. et al. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am Rev Respir Dis.* 1990.
- Duro G. et al. cDNA cloning, sequence analysis and allergological characterization of Par j 2.0101, a new major allergen of the *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Lett.* 1996.
- Duro G. et al. Isolation and characterization of two cDNA clones coding for isoforms of the *Parietaria judaica* major allergen Par j 1.0101. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997.
- Edlund AF. et al. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell.* 2004.
- Edwards R. and Dixon D.P. Metabolism of natural and xenobiotic substrates by the plant glutathione S-transferase family. *Molecular Ecotoxicology of Plants.* 2004.
- Fahy O. et al. Synergistic effect of diesel organic extracts and allergen Der p 1 on the release of chemokines by peripheral blood mononuclear cells from allergic subjects: involvement of the map kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000.
- Galanter J. et al. ORMDL3 gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations. *Am J Respir Crit Care Med* 2008.
- Galassi C. et al. Changes in prevalence of asthma and allergies among children and adolescents in Italy: 1994-2002. *Pediatrics.* 2006.
- Gauderman WJ. et al. Childhood asthma and exposure to traffic and nitrogen dioxide. *Epidemiology.* 2005.
- Gilliland FD. et al. Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *Lancet.* 2004.
- Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (GINA). Bethesda (MD): National Institutes of Health; National Heart, Lung, and Blood Institute. Available at: <http://www.ginasthma.org>. Updated 2008.
- Goldberg AD. et al. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* 2007.
- Goodwin RD. and Cowles RA. Household smoking and childhood asthma in the United States: a state-level analysis. *J Asthma.* 2008.
- Guerra S. Martinez FD. Asthma genetics: from linear to multifactorial approaches. *Annu Rev Med.* 2008.
- Hancock DB. et al. Genome-wide association study implicates chromosome 9q21.31 as a susceptibility locus for asthma in mexican children. *PLoS Genet.* 2009.
- Hawkins GA. et al. Clinical consequences of ADRbeta2 polymorphisms. *Pharmacogenomics.* 2008.

- Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* 1999.
- Hayes JD. et al. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005.
- Higgins PS. et al. Risk factors for asthma and asthma severity in nonurban children in Connecticut. *Chest.* 2005.
- Himes BE. et al. Genome-wide association analysis identifies PDE4D as an asthma-susceptibility gene. *Am J Hum Genet.* 2009.
- Hirota T. et al. Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. *J Allergy Clin Immunol* 2008.
- Hjelmqvist L. et al. ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome Biol.* 2002.
- Ho SM. Environmental epigenetics of asthma: an update. *J Allergy Clin Immunol.* 2010.
- Hoffjan S. Ober C. Present status on the genetic studies of asthma. *Curr Opin Immunol.* 2002.
- Holloway JW, Koppelman GH. 17q21 variants and asthma - questions and answers. *N Engl J Med.* 2008.
- Holloway JW. et al. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2010.
- Horak F. Jr. et al. Particulate matter and lung function growth in children: a 3-yr follow-up study in Austrian schoolchildren. *Eur Respir J.* 2002.
- Huang H. He X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol.* 2008.
- Ichinose T. et al. Enhancement of antigen-induced eosinophilic inflammation in the airways of mast-cell deficient mice by diesel exhaust particles. *Toxicology.* 2002.
- Ito T. et al. Effect of diesel exhaust particles on mRNA expression of viral and bacterial receptors in rat lung epithelial L2 cells. *Toxicol Lett.* 2006.
- Ji X. et al. Structure and function of residue 104 and water molecules in the xenobiotic substrate-binding site in human glutathione S-transferase P1-1. *Biochemistry.* 1999.
- Jones B. Chen J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *EMBO J.* 2006.
- Kamada F. et al. The *gstp1* gene is a susceptibility gene for childhood asthma and the *gstm1* gene is a modifier of the *gstp1* gene. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007.

- Kawanaka Y. et al. Simple and sensitive method for determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel exhaust particles by gas chromatography-negative ion chemical ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007.
- Ketterer B. A bird's eye view of the glutathione transferase field. *Chem Biol Interact*. 2001.
- Kim JJ. et al. Residential traffic and children's respiratory health. *Environ Health Perspect*. 2008.
- Klose RJ. Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*. 2006.
- Knox B. Suphioglu C. Environmental and molecular biology of pollen allergens. *Trends in plant science*. 1996.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007.
- Künzli N. et al. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet*. 2000.
- Leung TF. et al. Asthma and atopy are associated with chromosome 17q21 markers in Chinese children. *Allergy* 2009.
- Leynaert B. et al. Perennial rhinitis: An independent risk factor for asthma in nonatopic subjects: results from the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol*. 1999.
- Lin L. et al. Review of recent advances in detection of organic markers in fine particulate matter and their use for source apportionment. *J Air Waste Manag Assoc*. 2010.
- London SJ. Gene-air pollution interactions in asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2007.
- López-Campos JL. et al. Temporal trends in asthma mortality over 30 years. *J Asthma*. 2008.
- Madore AM. et al. Replication of an association between 17q21 SNPs and asthma in a French-Canadian familial collection. *Hum Genet* 2008.
- Mak JC. et al. Relationship between glutathione s-transferase gene polymorphisms and enzyme activity in hong kong chinese asthmatics. *Clin Exp Allergy*. 2007.
- Mall MA. Role of cilia, mucus, and airway surface liquid in mucociliary dysfunction: lessons from mouse models. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2008.
- McCarthy MI. et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet*. 2008.
- McCreanor J. et al. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med*. 2007.

- Micaloni C. et al. Engineering a new C-terminal tail in the H-site of human glutathione transferase P1-1: structural and functional consequences. *J Mol Biol.* 2003.
- Miller RL. Ho SM. Environmental epigenetics and asthma: current concepts and call for studies. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008.
- Moffatt MF. et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature.* 2007.
- Mohapatra SS. and Boyapalle S. Epidemiologic, experimental, and clinical links between respiratory syncytial virus infection and asthma. *Clin Microbiol Rev.* 2008.
- Moore WC. et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010.
- Nagafuchi A. et al. The roles of catenins in the cadherin-mediated cell adhesion: functional analysis of E-cadherin-alpha catenin fusion molecules. *J Cell Biol.* 1994.
- Nieminen MM. et al. A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs. *Chest.* 1991.
- Olsen CE. et al. Arsenic upregulates MMP-9 and inhibits wound repair in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008.
- Palmer LJ. et al. Independent inheritance of serum immunoglobulin E concentrations and airway responsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000.
- Parnia S. et al. The role of pollutants in allergic sensitization and the development of asthma. *Allergy.* 2002.
- Parra EJ. et al. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *Am J Hum Genet.* 1998.
- Patil C. Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol.* 2001.
- Pearce N, Douwes J. The global epidemiology of asthma in children. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006.
- Polosa R. et al. Expression of c-erbB receptors and ligands in human nasal epithelium. *J Allergy Clin Immunol.* 2000.
- Qiang YW. Rudikoff S. Wnt signaling in B and T lymphocytes. *Front Biosci.* 2004.
- Redon R. et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006.
- Reid CE, Gamble JL. Aeroallergens, allergic disease, and climate change: impacts and adaptation. *Ecohealth.* 2009.
- Reynolds AB. et al. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol.* 1994.

- Riedl M. Diaz Sanchez D. Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol.* 2005.
- Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature.* 2000.
- Rodriguez A. et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004.
- Runswick S. et al. Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions. *Respirology.* 2007.
- Salvi S. et al. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999.
- Sarafino EP. and Goldfedder J. Genetic factors in the presence, severity, and triggers of asthma. *Arch Dis Child.* 1995.
- Shah SD. et al. Emission rates of particulate matter and elemental and organic carbon from in-use diesel engines. *Environ Sci Technol.* 2004.
- Shaida A. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2001.
- Sheehan D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001.
- Sladek R. et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 2007.
- Sleiman PM. et al. ORMDL3 variants associated with asthma susceptibility in North Americans of European ancestry. *J Allergy Clin Immunol* 2008.
- Steerenberg PA. et al. A pollen model in the rat for testing adjuvant activity of air pollution components. *Inhal Toxicol.* 1999.
- Steinke JW., Rich S.S. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunology* 2008.
- Strachan T. Read AP. "Genetica umana e molecolare". Edizioni UTET Torino 1999.
- Strange RC. et al. Glutathione-s-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 2001.
- Taguchi M. et al. Patterns for RANTES secretion and intercellular adhesion molecule 1 expression mediate transepithelial T cell traffic based on analyses in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 1998.
- Takano H. et al. Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997.
- Takizawa H. et al. Diesel exhaust particles up-regulate expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human bronchial epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2000.

- Tamer L. et al. Glutathione-s-transferase gene polymorphisms (gstt1, gstm1, gstp1) as increased risk factors for asthma. *Respirology*. 2004.
- Tavendale R. et al. A polymorphism controlling ORMDL3 expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications. *J Allergy Clin Immunol* 2008.
- Taverna S. et al. Effects of *Parietaria judaica* pollen extract on human microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008.
- Tian D. et al. Cigarette smoke extract induces activation of beta-catenin/TCF signaling through inhibiting GSK3beta in human alveolar epithelial cell line. *Toxicol Lett*. 2009.
- Tiwari VK. et al. PcG proteins, DNA methylation, and gene repression by chromatin looping. *PLoS Biol*. 2008.
- Tosi MF. et al. Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effects on neutrophil-epithelial cell adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992.
- Valdar W et al. Genetic and environmental effects on complex traits in mice. *Genetics*. 2006.
- Van Eerdewegh P. et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*. 2002.
- van Panhuys N. et al. Epigenetic regulation of Th2 cytokine expression in atopic diseases. *Tissue Antigens*. 2008.
- Varga EM. et al. Cellular infiltration and cytokine mRNA expression in perennial allergic rhinitis. *Allergy*. 1999.
- Vercelli D. Genetics and biology of asthma 2010: La' ci darem la mano... *J Allergy Clin Immunol*. 2010.
- Verlaan DJ. et al. Allele-specific chromatin remodeling in the ZBP2/GSDMB/ORMDL3 locus associated with the risk of asthma and autoimmune disease. *Am J Hum Genet*. 2009.
- Wang X. et al. Effects of cigarette smoke extract on E-cadherin expression in cultured airway epithelial cells. *J Tongji Med Univ*. 2000.
- Watson MA. et al. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*. 1998.
- Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 1998.
- Yeatts K. et al. Coarse particulate matter (PM_{2.5-10}) affects heart rate variability, blood lipids, and circulating eosinophils in adults with asthma. *Environ Health Perspect*. 2007.

- Yin Z. et al. Glutathione s-transferase p elicits protection against h₂o₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res.* 2000.
- Yun YP. et al. Induction of nuclear factor-kappaB activation through TAK1 and NIK by diesel exhaust particles in L2 cell lines. *Toxicol Lett.* 2005.
- Zhang Y. et al. A genome-wide screen for asthma-associated quantitative trait loci in a mouse model of allergic asthma. *Hum Mol Genet.* 1999.
- Zhu J. Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008.
- Zhu M. et al. Glycogen synthase kinase 3beta and beta-catenin are involved in the injury and repair of bronchial epithelial cells induced by scratching. *Exp Mol Pathol.* 2007.